

**Pontificia Universidad Católica del Ecuador**

**Escuela de Bioanálisis**

**Disertación Previa a la obtención del Título de Bioquímica Clínica**

**Título**

Determinación de la resistencia a la claritromicina como fármaco de primera línea, en aislamientos de *Helicobacter pylori* provenientes de biopsias gástricas del Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas N°1, mediante técnicas fenotípica (E-test), molecular (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y secuenciación genómica, durante el período julio-diciembre 2015

**Autor de la disertación**

Katherine Viviana Guzmán Guerrero

**Nombre del Director**

Doctor Luis Santiago Escalante Vanoni

Quito, 2016

## **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

### **DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN**

Yo, **KATHERINE VIVIANA GUZMÁN GUERRERO con C.I: 1722771530** autor/a del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de la resistencia a la claritromicina como fármaco de primera línea, en aislamientos de *Helicobacter pylori* provenientes de biopsias gástricas del Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas N°1, mediante técnica fenotípica (E-test), molecular (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y secuenciación genómica, durante el período julio-diciembre 2015”, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **ESCUELA DE BIOANÁLISIS**.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

**KATHERINE VIVIANA GUZMAN GUERRERO**

**C.I. 1722771530**

## DEDICATORIA

*A mi familia en especial a mi madre; además a mi padre y Cathy, pero con gran realce a mis hermanos Carolina, David y Mariangel. Para todos y cada uno de ellos que siempre han sabido ser mi apoyo y orgullo, esto es por y para ustedes.*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi madre por ser el apoyo incondicional, por no haberme dejado sola en ningún momento y enseñarme que todo lo que se empieza se debe terminar.

Agradezco a mi padre y Cathy por su paciencia con un apoyo incondicional durante el recorrido de mi carrera profesional como durante mi vida entera.

Gracias a mis hermanos Carolina, David, y Mariangel por ser las personas que más cariño y animo me dieron para seguir adelante; a ti Carito por tu paciencia y amor incondicional y por no dejarme decaer jamás.

Un agradecimiento profundo al Dr. Jorge Reyes y a mi tutor Dr. Santiago Escalante por haberme permitido formar parte del proyecto de investigación, por su dedicación, tiempo y apoyo. Al mismo tiempo agradezco al Instituto de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos -INSPI al área de Microbiología y Biología molecular por abrirme las puertas permitiéndome el espacio para realizar el proyecto y por su constante apoyo en el proceso de investigación.

Gracias a todos mis familiares y amigos que me han apoyado para culminar este trabajo, en especial a mi compañero durante este arduo e interesante proyecto, Eduardo Morales.

Finalmente pero no menos importante quiero agradecer a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, especialmente a la Escuela de Bioanálisis por la formación académica en Bioquímica Clínica; pero sobre todo por enseñarme a desarrollar mis valores profesionales, humanos y éticos en el área de la salud e investigación.

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
LISTA DE SIGLAS .....	5
CAPITULO I.....	6
1 INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 PROBLEMA .....	6
1.1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	8
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	9
1.3 OBJETIVOS.....	11
1.3.1 GENERAL.....	11
1.3.2 ESPECÍFICOS.....	11
CAPITULO II .....	12
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	12
2.1 ANTECEDENTES.....	12
2.2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
2.2.1 Historia.....	14
2.2.1.1 Características microbiológicas .....	14
2.2.1.2 Características microbiológicas .....	15
2.2.2 Epidemiología .....	16
2.2.3 Transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .....	17
2.2.3.1 Transmisión oral – oral .....	18
2.2.3.2 Transmisión fecal-oral .....	19
2.2.3.3 Transmisión gastro-oral .....	19

2.2.3.5	Transmisión zoonótica .....	19
2.2.4	Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> .....	20
2.2.4.1	Ureasa .....	20
2.2.4.2	Adhesina .....	21
2.2.4.2.1	HpaA ( <i>Helicobacter pylori</i> adhesin A) .....	21
2.2.4.2.2	BabA (blood antigen binding adhesion) .....	21
2.2.4.2.3	SabA (sialic acid binding adhesion) .....	21
2.2.4.2.4	Alp A y Alp B (adherence asociated lipoprotein) .....	22
2.2.4.2.5	OipA (Proteína inflamatoria externa A) .....	22
2.2.4.3	Porinas.....	22
2.2.4.4	VacA (vacuolating citotoxin).....	22
2.2.4.5	CagA (cytotoxin-associated gene A).....	23
2.2.4.6	LPS (lipopolisacárido) .....	23
2.2.4.7	Flagelos .....	24
2.2.5	Aspectos clínicos .....	24
2.2.5.1	Gastritis crónica.....	24
2.2.5.2	Úlcera péptica.....	25
2.2.5.3	Linfoma de Tejido Linfático Asociado a Mucosas ( <i>MALT</i> ) .....	26
2.2.5.4	Cáncer gástrico.....	26
2.2.6	Diagnóstico de <i>H. pylori</i> .....	27
2.2.6.1	Técnicas invasivas .....	28
2.2.6.1.1	Prueba rápida de la ureasa .....	28
2.2.6.1.2	Histología.....	28
2.2.6.1.3	Cultivo .....	29
2.2.6.1.4	Técnicas moleculares.....	30
2.2.6.2	Técnicas no invasivas .....	31

2.2.6.2.1	Prueba del aliento .....	31
2.2.6.2.2	Serología.....	32
2.2.6.2.3	Detección de antígenos en heces fecales .....	32
2.2.7	Tratamiento .....	33
2.2.8	Resistencia a los antibióticos .....	34
2.2.9	Resistencia a la claritromicina en <i>Helicobacter pylori</i> .....	35
2.2.9.1	Mutaciones puntuales en el 23S RNAr.....	36
2.2.10	Detección de la resistencia a la claritromicina.....	36
2.2.10.1	Prueba Épsilon (E-test).....	36
2.2.10.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
2.3	MARCO CONCEPTUAL.....	39
CAPITULO III .....		41
MATERIALES Y METODOS .....		41
3.1.	Tipo de estudio .....	41
3.2	Población de estudio y muestra .....	41
3.3	Criterios de inclusión.....	41
3.4	Criterios de exclusión .....	42
3.5	Tamaño de la muestra.....	42
3.6	MATERIALES Y REACTIVOS .....	43
3.7	PROCEDIMIENTO .....	45
3.7.1	FASE I .....	45
3.7.1.1	Aprobación del estudio y firma del consentimiento informado.....	45
3.7.1.2	Toma de muestra.....	46
3.7.2	FASE II .....	46
3.7.2.1	Transporte de las biopsias gástricas .....	46
3.7.3	FASE III.....	46

3.7.3.1	Sembrado de las biopsias gástricas .....	46
3.7.3.2	Preservación de muestras .....	47
3.7.4	FASE IV.....	47
3.7.4.1	Antibiograma .....	47
3.7.5	FASE V .....	47
3.7.5.1	Amplificación del 23S RNAr, estudio de las mutaciones puntuales en cepas de <i>Helicobacter pylori</i> resistentes a la claritromicina .....	47
3.7.5.1.1	Extracción de ADN de las cepas de <i>H. pylori</i> .....	47
3.7.5.1.2	Amplificación del gen 23S RNAr .....	47
3.7.5.1.3	Purificación y secuenciación .....	48
3.7.5.1.3.1	Purificación.....	48
3.7.5.1.3.2	Secuenciación .....	48
CAPITULO IV .....		49
RESULTADOS .....		49
4.1	Población de estudio.....	49
4.2	Estudio histopatológico .....	50
4.3	Cultivo .....	51
4.3.1.	Relación Cultivo -Histopatológico .....	51
4.4	Antibiograma .....	51
4.5	Electroforesis del gen 23S RNAr .....	53
4.6	Presencia de mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr .....	54
DISCUSIÓN.....		56
CONCLUSIONES .....		60
RECOMENDACIONES .....		61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		62
ANEXOS.....		76



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características de los datos demográficos de los muestra recogidas .....	49
Tabla 2 Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> a nivel histopatológico y microbiológico con relación al diagnóstico anatómo-patológico.....	50
Tabla 3 Características microbiológicas de las cepas aisladas de <i>H. pylori</i> .....	51
Tabla 4 Interpretación del antibiograma realizado con MIC claritromicina .....	52
Tabla 5 Relación del diagnóstico con el perfil de susceptibilidad a la claritromicina .....	53
Tabla 6 Mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr, resistencia a la claritromicina. ....	55
Tabla 7 Master Mix para el 23S de <i>Helicobacter pylori</i> .....	99

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Claritromicina – MIC (0,016-256µg/mL).....	52
Gráfico 2 Corrida electroforética de PCR para detectar la presencia del 23S RNAr.....	54
Gráfico 3 Alineación de secuencias del fragmento 23S RNAr de las muestras PHPE 22, PHPE 80 para observar la mutación A2144G.....	109
Gráfico 4 Alineación del fragmento 23S RNAr de la muestra PHPM 28, mutación T2183C .....	110
Gráfico 5 Alineación de la secuencia del fragmento 23S RNAr de la muestra PHPM 34, presencia de la mutación G2221A .....	110
Gráfico 6 Distribución de pacientes según grupo de edad .....	111
Gráfico 7 Distribución de paciente según género .....	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de <i>Helicobacter pylori</i> mediante microfotografía electrónica .....	15
Figura 2 Características de las colonias de <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
Figura 3 Vías de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .....	18
Figura 4 <i>Helicobacter pylori</i> Selective Supplement (DENT) .....	76
Figura 5 Componentes y condiciones del Wizard Genomic DNA Purification Kit .....	77
Figura 6 Componentes y condiciones del Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System .....	78
Figura 7 Esquema gráfico del método E-test .....	93
Figura 8 Cálculo del Índice Kappa de Cohen en el programa SPSS.....	111

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Preparación de tubos estériles con solución salina.....	85
Fotografía 2 Retorno de las biopsias gástricas al laboratorio de microbiología dentro de las 5 horas desde su toma.....	85
Fotografía 3 Corte de las biopsias gástricas con material estéril .....	86
Fotografía 4 Sembrado de las biopsias gástricas en Agar Columbia con 7% sangre de cordero .....	86
Fotografía 5 Incubación de las muestras en condiciones microaerófilas .....	87
Fotografía 6 Colonias de <i>H. pylori</i> en agar Columbia después de días de incubación .....	87
Fotografía 7 Colonias de <i>H. pylori</i> para realizar la identificación .....	88
Fotografía 8 Tinción GRAM de las colonias de <i>H. pylori</i> .....	88
Fotografía 9 Prueba de catalasa.....	89
Fotografía 10 Prueba de oxidasa .....	90
Fotografía 11 Caldo BHI + 20% glicerol + 10% suero humano, dosificado en tubos eppendorf para el almacenamiento de colonias puras de <i>H. pylori</i> .....	92
Fotografía 12 Colonias de <i>H. pylori</i> colocados en el caldo de BHI antes de ser almacenadas a -70°C .....	92
Fotografía 13 MIC Sensible a la Claritromicina en colonias de <i>H. pylori</i> .....	94
Fotografía 14 MIC Resistente a la Claritromicina en colonias de <i>H. pylori</i> .....	95

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I Componente antimicrobiano del <i>Helicobacter pylori</i> Selective Supplement (Dent)	76
ANEXO II Componentes del Kit de extracción y purificación de DNA	77
ANEXO III Consentimiento Informado para el paciente que participa en el estudio	79
ANEXO IV Proceso de endoscopia digestiva alta	82
ANEXO V Sembrado e Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	84
ANEXO VI Ilustración gráfica del transporte y sembrado de biopsias gástricas	85
ANEXO VII Ilustración gráfica de la identificación de colonias de <i>H. pylori</i>	88
ANEXO VIII Procedimiento para la crio-preservación de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	91
ANEXO IX Protocolo del antibiograma por el método de tirrila de gradiente (E-test)	93
ANEXO X Puntos de corte para <i>H. pylori</i> . EUCAST, 2016	96
ANEXO XI Protocolo de Extracción mediante el uso de Wizard® Genomic DNA Purification Kit	98
ANEXO XII Protocolo de trabajo para la PCR	99
ANEXO XIII Protocolo de la purificación mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	100
ANEXO XIV Procedimiento para enviar las muestras a secuenciar en MacroGen	101
ANEXO XV Datos de los pacientes presentes en estudio	102
ANEXO XVI Alineación de las secuencias del 23S RNAr e identificación de las mutaciones puntuales	109
ANEXO XVII Gráficos de cálculos estadísticos	111

## RESUMEN

La erradicación de *Helicobacter pylori*, desde su identificación hasta la relación que presenta con las diversas patologías gastrointestinales se ha convertido en un reto a nivel de salud pública, su tratamiento ha ido variando en los últimos años a causa de que es una bacteria que no se cultiva de forma rutinaria en un laboratorio y conocer su perfil de susceptibilidad antimicrobiana es complicado. En la actualidad la triple terapia estándar es la más aplicada, consiste en un inhibidor de bomba de protones junto a dos antibióticos metronidazol, claritromicina o amoxicilina. La claritromicina es uno de los antibióticos que se usa con frecuencia en la triple terapia estándar debido a que su eficacia es mayor al 80% en la erradicación de la bacteria. Sin embargo, en los últimos años esta eficiencia ha ido decreciendo debido a que *H. pylori* ha adquirido mecanismo de resistencia.

La resistencia a la claritromicina se debe a que este macrólido también se usa en el tratamiento de infecciones respiratorias y de piel, razón por la cual se convierte en un factor de resistencia. Así como, la presencia de mutaciones en el 23S RNAr del microorganismo, el cual se debería correlacionar con el perfil fenotípico para que se siga evitando un tratamiento empírico y la presencia del fracaso terapéutico.

La variación en los diferentes países presenta un rango entre el 0 – 60% de resistencia a la claritromicina, no obstante esta variante depende de cada país o región. Los estudios realizados en nuestro país son limitados con respecto al perfil de susceptibilidad de *H. pylori*. En esta investigación se realiza el cultivo de biopsias gástricas de antro y cuerpo para aislar cepas de *H. pylori*, a las cuales se determina la susceptibilidad antibiótica mediante el uso de la técnica de tirilla E-test, del mismo modo por técnicas moleculares como PCR y secuenciación para identificar las mutaciones puntuales.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el porcentaje de recuperación en las muestras clínicas mediante el cultivo es el 42,4%; el perfil de susceptibilidad a la claritromicina indica un porcentaje mayor al 60% de resistencia a la claritromicina; en cuanto a la determinación genotípica se evidencio la presencia de mutaciones puntuales en el 23S RNAr, en la posición 2144 (A→G), 2183(T→C), 2221 (G→A). Finalmente, se encontró que la resistencia a la claritromicina ha aumentado, que ciertas cepas resistentes presentaron mutaciones en el 23S RNAr, de modo que es necesario seguir investigando acerca del perfil de

susceptibilidad antibiótica, para correlacionar la resistencia fenotípica con la presencia de mutaciones puntuales, y cuál es la más prevalente.

## **PALABRAS CLAVES**

*Helicobacter pylori*, claritromicina, resistencia, mutaciones puntuales, 23S RNAr

## ABSTRACT

The eradication of *Helicobacter pylori*, since its identification until the relationship up presents with the different gastroduodenal disease has become in a challenge at public health level, even its treatment has been changing in the last years because it is not a bacterium which is not cultivated as routine in a laboratory and to know its antimicrobial susceptibility profile is complicated. In the actuality the triple therapy is more applied and it consists in an proton pump inhibitor with two antibiotics metronidazole, clarithromycin or amoxicillin. Clarithromycin is one of the antibiotics frequently used in triple standard therapy because its effectiveness is greater than 80% in the eradication of bacterium. However, in the last years this effectiveness has been decreased because *H. pylori* has acquired a resistance mechanism

The resistance to Clarithromycin is because this macrolide is used in respiratory tract infections and skin infection treatments, for this reason becomes a resistance factor. The presence of mutations in the 23S RNAr of the microorganism, which should be correlated with the phenotypic profile to continue avoiding empirical treatment and the presence of therapeutic failure

The variation in different countries showing a range between 0 - 60%. In addition considering the variation depends of each country or region. The studies made in our country are limited relative susceptibility profile of *H. pylori*. In this research technique E-test strip is used to determine the phenotypic susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsies from antrum and body. The strains isolated from these samples were also processed by molecular techniques such as PCR and sequencing to identify point mutations.

The results of resistance and sensitivity to clarithromycin were determined in isolated strains, the recovery rate in clinical specimens by culture is 42.4%; with respect to phenotypic susceptibility data shows a percentage higher than 60% of clarithromycin resistance, just as some strains with MIC variables PCRs were performed and sequenced to detect the presence of point mutations in the 23S rRNA, being three types of mutations in position 2144 (a → G), 2183 (T → C), 2221 (G → a). Finally, it was found that resistance to clarithromycin is higher than certain resistant strains which had shown mutations in the 23S



rRNA, so further research is needed to study susceptibility profile, correlate the phenotypic resistance with find which of the mutations found is the most prevalent.

## **KEYWORDS**

*Helicobacter pylori*, clarithromycin, resistance, point mutations, 23S rRNA

## LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMX	Amoxicilina
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
CLA	Claritromicina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DA	Dilución en agar
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G	Guanina
GTP	Guanosín Trifosfato
I	Intermedio
INSPI	Instituto de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos
LEV	Levofloxacin
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Linfoma de Tejido Linfático Asociado a Mucosas
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MTZ	Metronidazol
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NH <sub>3</sub>	Amoniac
O <sub>2</sub>	Oxígeno
pH	Potencia de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
R	Resistente
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribosomal
S	Sensible
T	Tiamina
TC	Tetraciclina

## CAPITULO I

### 1 INTRODUCCIÓN

#### 1.1 PROBLEMA

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa, produce infecciones gastrointestinales afectando entre el 50% al 80% de la población mundial; en países desarrollados la prevalencia es de 30-50% a diferencia de los países en vía de desarrollo que es mayor al 70% (Vallejos M et al., 2007) (Hunt, 2010). La infección ocasionada por este microorganismo es la más frecuente en el ser humano, se presenta inicialmente en la infancia y puede persistir durante toda la vida de manera asintomática (Ramírez Ramos & Sánchez Sánchez, 2008). Desde su descubrimiento se han modificado los conceptos de la fisiopatogenia de la bacteria (F. Sánchez et al., 2007).

Se asocia a diversas enfermedades que afectan al estómago como al intestino, siendo las más comunes la gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma tipo MALT (Espino, 2010), además es el agente causal de cáncer gástrico, debido a que *H. pylori* es considerado como bacteria carcinógena tipo I según *la International Agency for Research on Cancer* (Romo González & Coria, 2010) (Henao Riveros, Quiroga, Martinez, & Otero Regino, 2009).

La erradicación de *H. pylori* es indispensable para el médico clínico, aunque en los últimos años se ha vuelto un desafío (Otero Regino, Trespalacios, & Otero, 2009). El tratamiento recomendado para su eliminación es la triple terapia estándar la cual usa un inhibidor de la bomba de protones con dos antibióticos (claritromicina (CLA)), amoxicilina (AMX) o metronidazol (MTZ)) (Malfertheiner et al., 2012). Este tratamiento presenta una eficacia mayor del 80%, no obstante esta efectividad ha ido disminuyendo, y puede atribuirse a diversos factores, como son: dosis inadecuada de los medicamentos, abandono del tratamiento, aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Henao, Quiroga, Martínez, & Otero, 2009) (Otero Regino et al., 2009).

La claritromicina es uno de los antibióticos que se usa con frecuencia para el tratamiento de *H. pylori*; generalmente las cepas son sensibles con una erradicación mayor al 90% (González C et al., 2001); sin embargo, cuando las cepas presentan resistencia a la claritromicina reducen la efectividad de la terapia entre un 20% a 40% (Pajares García, Pajares-Villarroya, & Gisbert, 2007) (Henao et al., 2009).

Entre las principales causas de la resistencia a la claritromicina en *H. pylori* se encuentra la presencia de mutaciones puntuales en el dominio V del 23S *rRNA*, donde se inhibe la unión de la claritromicina a la subunidad ribosomal 50S (Occhialini et al., 1997) (Nishizawa & Suzuki, 2014), entre las más frecuentes se describe A2143G seguida de A2142G y A2142C (Abdollahi, Savari, Zahedi, Moghadam, & Abasi, 2011) (Occhialini et al., 1997) (Klesiewicz et al., 2014). Sin embargo, otros estudios revelan que en los últimos años han parecido otras mutaciones en menor proporción T2243C, C2245T, G2244A, T2289C, T2182C, A2146G, A2147G, A2115G, G2141A (Nishizawa & Suzuki, 2014)(Wu et al., 2014)(González C et al., 2001)

La resistencia primaria a la claritromicina varía en diferentes países y es considerado como uno de los principales factores de fracaso terapéutico volviéndose un verdadero reto clínico. Esta resistencia en América Latina, por ejemplo, fluctúa entre el 2% al 60%, siendo en Colombia donde se encuentra la resistencia más alta con el 60%, Chile 9,1-20%, Venezuela con el 7%, Costa Rica 6% y Paraguay 2% (Camargo et al., 2015) (Picoli et al., 2014)

En Ecuador los estudios a nivel fenotípico y genotípico de la resistencia a la claritromicina son escasos, dando a conocer que en el 2003 un estudio realizado en Guayaquil reveló que la resistencia a la claritromicina a nivel fenotípico es del 9,5% (4 cepas resistentes) sin referencias de mutaciones puntuales (Debets-Ossenkopp et al., 2003). Además se debe considerar que la prevalencia de resistencia a la claritromicina presenta variabilidad en las diferentes regiones de un país como se observa en estudios previos realizados en países de América Latina como Colombia (Martínez, Henao, & Lizarazo, 2014) (Acosta, Hurtado, & Trespalacios, 2013).

En el país el esquema que se sigue, también es la triple terapia estándar utilizando como antibiótico principal la claritromicina en combinación con amoxicilina o metronidazol y el inhibidor de protones (Debets-ossenkopp et al., 2003). Este tratamiento se aplica de manera empírica sin conocer si presentan alguna resistencia a los medicamentos utilizados para la erradicación (Yepes, Rodríguez, Ruiz, & Ariza, 2008). Es así que en la actualidad es necesario conocer acerca de la susceptibilidad antimicrobiana, particularmente al macrólido que se usa frecuentemente para la erradicación del microorganismo. Por tanto, al no conocer los datos de resistencia a la claritromicina, puede ocasionar los fracasos terapéuticos.

### **1.1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el porcentaje de resistencia a la claritromicina en cepas de *H. pylori* obtenidas a través del cultivo de biopsias gástricas mediante técnica fenotípica (E-test), técnica molecular (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y secuenciación genómica del Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas durante el periodo de julio a diciembre del 2015?

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* afecta a más del 80% de la población mundial, se asocia al estado socioeconómico de las personas; por tanto, en países en vía de desarrollo la presencia de afecciones gastrointestinales causadas por esta bacteria es mayor del 70% en relación a los países desarrollados que es menor del 50% (Bayona, 2013) (Vallejos M et al., 2007). También se asocia varias patologías gastrointestinales tales como gastritis crónica, úlceras pépticas, adenocarcinoma, linfomas tipo MALT y cáncer gástrico (Henao et al., 2009) (Romo González & Coria Jiménez, 2010).

Se ha demostrado que en los últimos años un importante aspecto del manejo de las enfermedades gastroduodenales es la erradicación de *Helicobacter pylori*, y que los tratamientos han ido cambiando para lograr su objetivo de suprimir al microorganismo (Javier Gisbert, 2011)

El tratamiento recomendado, la triple terapia estándar (inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos MTZ, CLA, AMX) presenta una eficacia mayor al 80% (Otero Regino et al., 2009), se combina el metronidazol o claritromicina junto con la amoxicilina (Malfertheiner et al., 2012). Por otro lado, antibióticos como la levofloxacin (LEV) y tetraciclina (TC) son recomendados cuando la terapia inicial falla, combinándose la tetraciclina con el metronidazol, y la levofloxacin como reemplazo de la claritromicina si la resistencia a este último antibiótico es alta (Otero Regino et al., 2009).

El esquema inicial con triple terapia estándar ha presentado falla terapéutica en diferentes partes del mundo, presentando tasas de erradicación entre 57-73% si el tratamiento dura 7 días, con un porcentaje del 67-79% cuando dura 10 días (Otero Regino et al., 2009) (Páramo, Rodríguez, & Toledo, 2014)

La resistencia a la claritromicina, ha aumentado cerca del 10% en los últimos años en América Latina presentando un rango entre el 2-63,1% en los diferentes países de la región. Esta variación de la resistencia se le puede asociar al consumo de macrólidos para tratar enfermedades respiratorias, de piel (Martínez et al., 2014)

En el Ecuador la información actual de la resistencia a los macrólidos es limitada. Un estudio realizado en el 2003, en el Hospital de Solca de Guayaquil, encontró una resistencia a la claritromicina del 9,5% (Debets-ossenkopp et al., 2003). A esto se suma que en países

vecinos al año 2009 la resistencia alcanzó el 20%, indicando la disminución de su efectividad provocando fallo terapéutico a nivel clínico (Henao et al., 2009).

En este contexto, es necesario obtener datos de resistencia en el Ecuador mediante pruebas de susceptibilidad a nivel fenotípico y molecular para detectar si existe resistencia a este fármaco. Este trabajo busca implementar técnicas fenotípicas (E-test) junto con Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación, para detectar resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en especial a la claritromicina como fármaco de primera línea en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*, lo que permitirá mejorar el esquema de tratamiento y evitar tratamientos empíricos con posibles fallos terapéuticos.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 GENERAL**

Determinar el porcentaje de resistencia a la claritromicina de cepas de *Helicobacter pylori* a través de biopsias gástricas obtenidas mediante técnicas fenotípica (E-test) y presencia de mutaciones puntuales por técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y secuenciación del ADN en el Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas, durante julio-diciembre del 2015.

### **1.3.2 ESPECÍFICOS**

- Establecer protocolos de trabajo para técnica fenotípica para la identificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias gástrica del Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas.
- Establecer la frecuencia de resistencia a la claritromicina en las cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas mediante técnica de concentración mínima inhibitoria.
- Establecer el tipo de mutaciones puntuales de los genes 23S RNAr por secuenciación del ADN
- Implementar la técnica molecular diagnóstica dentro del laboratorio de investigación.
- Validar la técnica molecular diagnóstica dentro del laboratorio de investigación.



## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1 ANTECEDENTES

*Helicobacter pylori* es una bacteria que coloniza a más de la mitad de la población mundial. En las últimas décadas ha aumentado la prevalencia de la resistencia a los antibióticos que se usan en el tratamiento para la eliminación del microorganismo (Rivera, Contreras, Terán, & Fouillieux, 2004) (Trespacios, Regino, & Reyes, 2010). La resistencia a la claritromicina tiene mayor relevancia clínica en comparación con los otros antibióticos, debido a que es el antimicrobiano que se usa frecuente en la triple terapia para que exista una mayor eficacia para tratar *Helicobacter pylori* (Pajares García et al., 2007).

En América Latina el rango de prevalencia de la resistencia a la claritromicina varía desde 2% al 61,3%, en las diferentes zonas geográficas; en cambio, en otros países como España presenta un promedio de resistencia del 6,7% (Martínez et al., 2014) (Pajares García et al., 2007)

En Colombia, en la Clínica Fundadores de Bogotá se realizaron estudios, en pacientes mayores de 18 años, acerca de la resistencia a la claritromicina, en el 2009 y 2010, dando el 15% y 17,72% correspondiente a cada año revelando que la eficacia en la erradicación de *H. pylori* disminuye (Henao et al., 2009) (Trespacios et al., 2010). En cambio en el año 2008 en el Hospital Universitario de San Ignacio-Bogotá se realizó un estudio de susceptibilidad al antibiótico mediante método de disco de difusión dando como resultado un 60% de resistencia a la claritromicina (Yepes et al., 2008).

Teniendo en cuenta, que en Colombia ha aumentado la resistencia a la claritromicina, estudios moleculares detectaron que se debe a la presencia de mutaciones puntuales en el 23S RNAr, mostrando que la mutación A2143G es la más frecuente en las cepas de *H. pylori* con respecto a la A2142G (Álvarez et al., 2009)

En el 2001 y 2007 en Chile se realizaron estudios *in vitro* de susceptibilidad a antibióticos para *Helicobacter pylori* detectándose inicialmente cepas resistentes a la claritromicina en 2,2% en el 2001, sin embargo, en el segundo estudio la tasa de resistencia al macrólido incrementa

dando 20%, siendo un factor notable en fracaso terapéutico (González C et al., 2001) (Vallejos M et al., 2007).

En el Departamento de Endoscopia Digestiva del Hospital de Clínicas de la Universidad Nacional de Asunción-Paraguay se realizó aislamientos de 60 pacientes. Mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) se obtuvo como resultado que existe un 2,2% de resistencia a la claritromicina, así como la aparición simultánea resistencia al metronidazol del 93% (Fariña et al., 2007)

En el 2014, en el Hospital de Porto Alegre de Brasil durante un año se recolectaron biopsias gástricas de varios pacientes a los que se les realizaba la prueba de ureasa, histopatológico y el cultivo, para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se estudiaron 54 cepas aisladas de *H. pylori* de las cuales el 11,1% presentó resistencia a la claritromicina usando la técnica de E-test (Picoli et al., 2014)

En el Ecuador los estudios son limitados sobre la resistencia a los macrólidos; sin embargo se considera que en los últimos años pudo aumentar con respecto a la investigación realizada en el 2003 en el Hospital de Solca de Guayaquil, de 86 pacientes se obtuvo el aislamiento de 42 cepas de *H. pylori*, que mediante concentración mínima inhibitoria se encontró 4 cepas resistentes a la claritromicina, que representa el 9,5% (Debets-ossenkopp et al., 2003).

Con estos antecedentes es clara la necesidad de realizar un estudio para determinar la susceptibilidad de los antibióticos de primera línea de *Helicobacter pylori*, como es la claritromicina, para establecer resistencia y presencia de mutaciones puntuales del gen 23S RNAr.

## 2.2 *Helicobacter pylori*

### 2.2.1 Historia

Esta bacteria fue descubierta en 1982 por dos investigadores Warren y Marshall, en Australia a través de biopsias gástricas (Stewart Goodwin et al., 1989). Se observó un microorganismo espiral, el cual al analizarlo presentaba características del género *Campylobacter*, en ese entonces fue conocido como *Campylobacter pylori* (Pajares & Gisbert, 2006), años más tarde aunque este microorganismo era predominante en el ser humano causando enfermedades gástricas e intestinales, se analizó su hibridación ADN, la bioquímica y sus características de crecimiento *in vivo*, *in vitro* (Stewart Goodwin et al., 1989) (Mikkonen, Kärenlampi, & Hänninen, 2004). Esto demostró que no pertenecía al género *Campylobacter*, creándose por lo tanto un nuevo género *Helicobacter* que se refería a los organismos que a nivel morfológico son helicoidal *in vivo*, mientras que *in vitro* tiene la forma de un bastoncillo (bacilo), cambiando su nombre a *Helicobacter pylori* (Stewart Goodwin et al., 1989) (Solnick & Schauer, 2001)

Aunque *Helicobacter* fue descubierto décadas atrás, es una infección bacteriana común en el humano (Pajares & Gisbert, 2006), esta bacteria va evolucionando junto con el hombre que es su reservorio, se considera que puede convivir con el ser humano varios siglos, lo demuestra el hallazgo de este microorganismo a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en momias mexicanas del año 1350 D.C (Serrano, Candelaria-Hernández, De la Garza, & Herrera, 2009) demostrando que la bacteria y el hospedero presentan una compleja relación, como resultado presentan variaciones en las diversas enfermedades (Espino, 2010) (Serrano et al., 2009).

#### 2.2.1.1 Características microbiológicas

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo curvo o en forma de “S”, microaerófilo, que posee de 4 a 8 flagelos polares de aproximadamente 30µm de longitud (Ramírez Ramos & Sánchez Sánchez, 2008) su función es permitirle movilidad, posee una vaina de estructura lipídica que protege a los flagelos y ayuda a soportar las contracciones rítmicas gástricas y penetrar en la mucosa gástrica, tiene una membrana externa, un tamaño de 2,4 – 0,4 µm de largo y 0,5 – 1,0 µm de ancho (Bayona, 2013) (Morris Brown, 2000)



**Figura 1 Estructura de *Helicobacter pylori* mediante microfotografía electrónica**

Fuente: Owen, R. (1998). *Helicobacter* - species classification and identification. *British Medical Bulletin*, 54(1), 17-30.

Obtenido de <http://bmb.oxfordjournals.org/content/54/1/17.full.pdf>

### **2.2.1.2 Características microbiológicas**

*Helicobacter pylori* es una bacteria muy exigente para su crecimiento, debido a que el ambiente para su desarrollo debe ser microaerófilico (Jorge Sánchez et al., 1999). Las muestras que se obtienen a partir de biopsias gástricas pueden ser cultivadas en medios no selectivos y selectivos, los mismos que deben estar complementados con sangre desfibrinada de cordero o caballo al 7-10%, suero y antibióticos (vancomicina, anfotericina B o polimixina B, trimetoprim, cefsulodina) (Bayona, 2013). Para evitar que se produzca la colonización del cultivo por agentes contaminantes que frecuentemente dificultan la viabilidad de la bacteria, con condiciones de una atmósfera de oxígeno (O<sub>2</sub>) al 5-10%, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) 5-10%, nitrógeno (N<sub>2</sub>) 80-90% e incubados a 37°C por 5-10 días; aunque, otros autores recomiendan que la incubación sea hasta 15 días (Majalca, Rivera, Ochoa, & Giono, 2001)(Bayona, 2013).

Al cumplir con estas condiciones de crecimiento se puede observar macroscópicamente colonias translúcidas pequeñas brillantes, las que se pueden identificar mediante tinción Gram, catalasa, oxidasa, ureasa que resultan positivas debido a que el microorganismo produce enzimas ureasa, catalasa y citocromo-oxidasa (Henao Riveros, Quiroga, Martinez, & Otero Regino, 2009)(Bayona, 2013).

El cultivo para la identificación de *H. pylori* es uno de los métodos más específicos presentan una sensibilidad variada 77% - 94%, y especificidad el 100% (Jaime Sánchez, Canizalez, León, Irineo, & Bernal, 2015) (Majalca-Martínez, Rivera, Ocho-Perez, & Giono, 2001). La recuperación de las cepas del microorganismo se encuentra entre el 30% al 70%, considerando el enriquecimiento del medio utilizado, la carga bacteriana que debe ser alta en la muestra a procesar, además que el procedimiento es largo y tedioso (Patel, Pratap, Jain, Gulati, & Nath, 2014) (Henao et al., 2009). No obstante, tiene como propósito la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos utilizados en el tratamiento de erradicación contra la bacteria (Patel et al., 2014) (Majalca-Martínez et al., 2001).



**Figura 2 Características de las colonias de *Helicobacter pylori***

Fuente: López, M. et al. (2015). *Helicobacterspain*. Obtenido de <http://www.helicobacterspain.com/imagenes/placa2.htm>

### **2.2.2 Epidemiología**

A nivel mundial más del 80% de la población se encuentra infectada con *Helicobacter pylori*, presentando gran variabilidad de acuerdo a la zona geográfica, edad, factores socioeconómicos (Picoli et al., 2014). En países desarrollados la infección por el microorganismo es menor al 50% aproximadamente, a diferencia de los países en vías de

desarrollo que es mayor del 80 al 90% de la población total (Vallejos M et al., 2007) (Hunt, 2010) (Washington, 1998).

Las personas pueden adquirir el microorganismo durante la infancia en un ambiente familiar, siendo esta forma de transmisión más comúnmente observada en los países en vías de desarrollo (70%-78%), mientras que en los países desarrollados lo adquieren en edades mayores (Ramírez Ramos & Sánchez Sánchez, 2008) (Ruiz Alvarez, Marin Julia, & Hernandez Triana, 2005).

La alta prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* y las diversas enfermedades gastrointestinales que producen como gastritis crónica, úlceras pépticas, adenocarcinoma, linfomas de MALT, incluso cáncer gástrico, constituye un problema de salud pública (Hunt, 2010) (Henao et al., 2009).

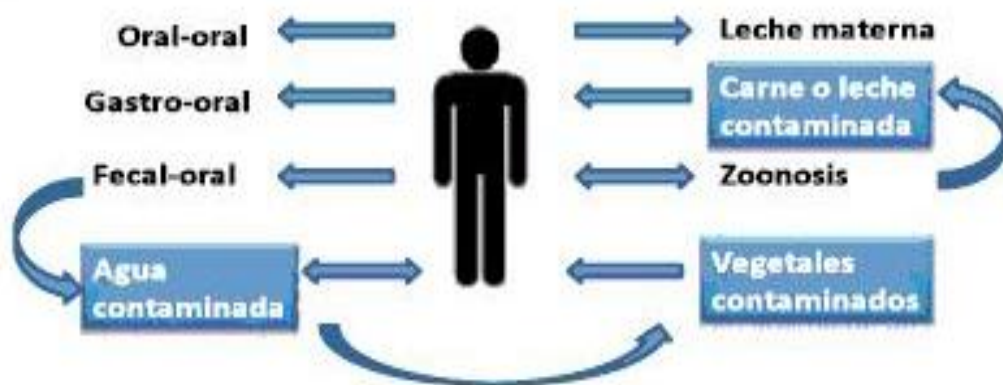
La erradicación de *H. pylori* por terapia inicialmente presentaba una eficacia del 90%, actualmente ha disminuido la eficacia terapéutica en un 57-73% si se aplicará 7 días de tratamiento y cuando es 10 días se puede alcanzar hasta 67-79%. Esta disminución se debe fundamentalmente a que las cepas del microorganismo han generado resistencia a los antibióticos del esquema de tratamiento (Trespacios et al., 2010). Esta resistencia es variable y se asocia al aumento del fracaso terapéutico en los últimos años, generándose un rango aproximado de resistencias a nivel de América Latina para el metronidazol del 12% al 95%, claritromicina del 2% al 63%, amoxicilina del 0% al 39%, tetraciclina del 0% al 86% (Pajares García et al., 2007) (Camargo et al., 2015) (Martínez et al., 2014)

### **2.2.3 Transmisión de *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* infecta al ser humano colonizando la mucosa gástrica, sin embargo esta bacteria es diferente de otros organismos porque se considera al hombre como su reservorio principal y su infección se limita al mismo (Cristina et al., 2014). Aunque también se ha detectado a este microorganismo en otros mamíferos como primates, cerdos, gatos domésticos, guepardos, osos polares, delfines se ha considerado la posibilidad de que exista una transmisión zoonótica aunque no se ha revelado estudios precisos más que hipótesis (Parra & Carballo, 1998) (Naranjo et al., 2012).

La transmisión de *H. pylori*, es principalmente el de persona a persona, sugiriendo que el contacto intrafamiliar sea el predominante, adquiriendo el microorganismo durante la infancia en los primeros años pero con mayor prevalencia a partir de los 10 años, otros tipos de transmisión en menor proporción se puede dar por la ingesta de alimentos y aguas contaminada (Amieva & El-Omar, 2008)(Parra & Carballo, 1998) (Palomino & Tomé Boschian, 2012).

Otra característica que se debe conocer de la bacteria para saber de su contagio es su morfología, inicialmente la bacteria tiene una forma bacilar espiral pero también se sugiere que bajo un ambiente con privaciones de nutrientes entre otros aspectos físicos o químico, *H. pylori* sufre una transformación morfológica cambiando a una forma cocoide (Regino, 2013). Se cree que esta forma es latente o estado durmiente, razón por la cual *in vitro* es viable pero no cultivable, además esta forma morfológica sobrevive a ambientes hostiles durante periodos largos hasta encontrar un ambiente propicio y volver a su forma infectante que es la estructura bacilar (Amieva & El-Omar, 2008) (Parra & Carballo, 1998).



**Figura 3 Vías de transmisión de *Helicobacter pylori***

Fuente: Montero, V. (2009). Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 18(2), 84 - 93. doi:ISSN 1409-1429

### 2.2.3.1 Transmisión oral – oral

El microorganismo se puede localizar de forma transitoria en la cavidad oral en la placa dental, saliva, lengua o mucosa de mejillas, el modo de contagio es impredecible porque puede

resultar a través de un beso, uso de utensilios o por consumir agua o alimentos contaminados (Parra & Carballo, 1998) (Palomino & Tomé Boschian, 2012) (De Argila & Boixeda, 2004).

#### **2.2.3.2 Transmisión fecal-oral**

La bacteria se puede cultivar mediante muestras de heces, cuando estas son expulsadas durante la fase aguda de la infección, además es más común encontrar en las heces de niños, por tanto las personas que entran en contacto con la materia fecal como personas que trabajan en asistencia sanitaria, así como el contacto con agua previamente contaminada con los productos fecales (Parra & Carballo, 1998) (Palomino & Tomé Boschian, 2012) (De Argila & Boixeda, 2004).

#### **2.2.3.3 Transmisión gastro-oral**

Se asocia con el vómito y los reflujos gástricos, al igual que el uso de instrumentos contaminados con desinfección inadecuada como los instrumentos usados para realizar endoscopias. Por tanto, también se la relaciona con la transmisión iatrogénica (Parra & Carballo, 1998) (Palomino & Tomé Boschian, 2012) (De Argila & Boixeda, 2004).

#### **2.2.3.4 Transmisión a través del agua**

Diferentes estudios han referido que el agua es un reservorio y una fuente de transmisión, debido a que el microorganismo puede sobrevivir en su forma cocoide, dándole mayor resistencia en estos ambiente acuáticos que presentan temperaturas bajas entre 4 y 15°C, la propagación procede de ríos, manantiales, pozos, y se lo puede correlacionar junto al estatus socioeconómico y situaciones de hacinamiento (Palomino & Tomé Boschian, 2012) (Parra & Carballo, 1998) (Morris Brown, 2000)

#### **2.2.3.5 Transmisión zoonótica**

En los últimos años también se le asocia esta transmisión por el contacto de animales que son posibles vectores de la bacteria como vacas, ovejas, gatos, moscas, monos, cucarachas; los que se asocian al falta de sanidad. Sin embargo, los estudios todavía siguen siendo controversiales, sin embargo se sigue considerando como principal reservorio al hombre (Palomino & Tomé Boschian, 2012) (Morris Brown, 2000)



#### **2.2.4 Factores de virulencia de *H. pylori***

La infección por *Helicobacter pylori* promueve diversas enfermedades gástricas e intestinales, aunque la mayoría de personas no presentan sintomatología pero desarrolla afecciones en las diferentes áreas en las que se ubique el microorganismo en la persona (Ramírez & Quintanilla, 2007) (Amieva & El-Omar, 2008). Esto se debe a que la patogénesis se encuentra influenciada por la interacción que tiene la bacteria con el huésped (ser humano), factores ambientales y los mismos factores de la bacteria (Torres & Rodríguez, 2008).

Los factores de virulencia que posee la bacteria causa daños a las células epiteliales, producción de citosinas que producen inflamación y daño al tejido gástrico, además el microorganismo al colonizar el estómago presenta mecanismos de defensa contra el pH ácido para colocarse en la mucosa gástrica (Torres & Rodríguez, 2008) (Olivares & Gisbert, 2006).

*H. pylori* posee factores de virulencia que ayudan a la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales (Amieva & El-Omar, 2008) (Olivares & Gisbert, 2006).

##### **2.2.4.1 Ureasa**

La ureasa es una enzima que contiene dos subunidades, representa aproximadamente el 10% del peso de proteínas de la bacteria, la cual se expresa en todas las cepas de *H. pylori* (Alzahrani, 2014). Presenta una actividad enzimática que hidroliza la urea en amoníaco y bicarbonato que amortigua las condiciones del pH ácido del estómago, permitiendo alcanzar la superficie de la mucosa. La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad mataría a la bacteria, y esto se produce mediante el UreI transportador dependiente de pH, que permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva (Beswick et al., 2006). Además la ureasa participa como una adhesina, aunque se encuentra intracelularmente también existen algunas en la superficie bacteriana, uniéndose al complejo de histocompatibilidad tipo II (MCHII) y CD74, la unión a estos complejos producen una respuesta inmunitaria induciendo la apoptosis la cual se la puede asociar al MCHII y junto con el CD74 participan en el daño del epitelio gástrico, se asocia con el desarrollo de gastritis atrófica crónica, incremento de infecciones virales y la carcinogénesis (Beswick et al., 2006)(Alzahrani, 2014).

#### **2.2.4.2 Adhesina**

Son proteínas de membrana externa de la bacteria, cuya función es importante para la virulencia de la misma, la adhesión se debe a un tropismo tisular de *H. pylori* con la superficie y espacios intercelulares del epitelio gástrico, el mecanismo de esta unión produce respuesta inflamatoria en la mucosa, secreción de toxinas bacterianas, cambios en el citoesqueleto permitiendo que la bacteria se internalice en las células epiteliales y otras se queden en la mucosa gástrica, además la adhesión le confiere protección a la bacteria contra el pH estomacal, movimientos peristálticos o vaciado gástrico (White, Winter, & Robinson, 2015)(Amieva & El-Omar, 2008).

Las adhesinas que presenta *H. pylori* se han relacionado con el daño epitelial como la presencia de patologías gástricas, las más estudiadas son las siguientes:

##### **2.2.4.2.1 HpaA (*Helicobacter pylori* adhesin A)**

Es una adhesina, unión de glucoconjugados a ácido siálico (N-acetil-neuraminil-lactosa) de la superficie de las células epiteliales gástricas y neutrófilos, codificado por el gen *hpaA* y es esencial para la colonización de la mucosa gástrica. Produce una respuesta inflamatoria y proliferación de linfocitos T y B (Barragan, Gutierrez, & Castiblanco, 2015)

##### **2.2.4.2.2 BabA (blood antigen binding adhesion)**

Es una proteína que se une al antígeno Lewis fucosilado B de la mucosa gástrica. Expresa el gen *babA*, las cepas con este gen ocasionan daños clínicos como atrofia gástrica, úlceras y cáncer (Amieva & El-Omar, 2008), debido a la expresión del sistema de secreción tipo IV (T4SS), induce el daño estructural del epitelio gástrico, además presenta algunos efectos en la adhesión de *H. pylori*, promueve la inflamación debido al aumento de infiltración granulocítica y expresión de IL-8 (White et al., 2015) (Hagymási & Tulassay, 2014).

##### **2.2.4.2.3 SabA (sialic acid binding adhesion)**

Es una proteína codificada por el gen *sabA*, se une al ácido siálico de las células gástricas como al antígeno Lewis-X (Amieva & El-Omar, 2008). Esta molécula induce el sistema oxidativo de las células junto con la respuesta inmune para penetrar en la células; contribuye a la inflamación crónica y las cepas productoras de esta proteína se asocia a alto riesgo de cáncer gástrico (White et al., 2015) (Hagymási & Tulassay, 2014).

#### **2.2.4.2.4 AlpA y AlpB (adherence asociated lipoprotein)**

Proteínas de adhesión codificadas por los genes *alpA* y *alpB*, se expresan únicamente en *Helicobacter pylori*, por lo cual son proteínas que determinan el tropismo de la bacteria con el epitelio gástrico. (Hagymási & Tulassay, 2014)

#### **2.2.4.2.5 OipA (Proteína inflamatoria externa A)**

Es una proteína de superficie se expresa por el gen *oipA*, considerada como una adhesina de fase variable que presenta varias funciones entre ellas es la producción de IL-8, IL-6 por las células epiteliales además de ayudar en la vía de señalización de las isla de patogenicidad cagPAI con la expresión del sistema de secreción tipo IV aumentando la inflamación. Y se la asocia con el riesgo de úlcera péptica y cáncer gástrico (White et al., 2015)(Hagymási & Tulassay, 2014).

#### **2.2.4.3 Porinas**

En *Helicobacter pylori* se las clasifica como Hop (Helicobacter outer membrane porins), se expresan en forma reducida, algunos estudios sugieren que pertenecen más a las proteínas de membrana externa (Hagymási & Tulassay, 2014). Entre las más estudiadas tenemos:

- ▶ HopE: Son canales prolongados, mediante difusión simple permiten el paso no selectivo de sustancias hidrofílicas.
- ▶ HopZ: Produce el gen *hopZ*, se ubica en la superficie bacteriana, y se encuentra regulado por el cambio de pH y por el contacto con las células epiteliales gástricas
- ▶ HopQ: Expresada por el gen *hopQ*, tiene un peso de 70kDa, se ubica en la superficie de *H. pylori* modulando su adhesión (Hagymási & Tulassay, 2014)

#### **2.2.4.4 VacA (vacuolating cytotoxin)**

Es una citotoxina de 87 kDa presenta dos subunidades A y B que pesan respectivamente 33 y 55 kDa, las cuales contribuyen conjuntamente en la vacuolización de las células epiteliales, considerado como un mecanismo de entrada por su unión con la esfingomielina aunque su mecanismo aún sigue en estudios (Yahaghi et al., 2014). Esta codificada por el gen *vacA* en las cepas de *H. pylori* tiene una expresión variable porque se presenta en un 60% de las cepas.

Son polimórficos con dos regiones y dos variantes alélicas: señal (s1/s2), intermedio

(i1/i2), medio (m1/m2) (Alzahrani, 2014) (González & Rodríguez, 2011). La presencia de s1 se liga a la actividad citotóxica *in vitro* de la bacteria y se le asocia a la presencia del gen *cagA*, en contraste las cepas s2 que se expresan en poca cantidad y producen una vacuolización leve (González & Rodríguez, 2011). En cambio, cuando en las cepas existe la combinación de las variantes alélicas las funciones que producen en el epitelio gástrico son más o menos agresivas, como el genotipo con s1/m1/i1 que produce más toxina vacuolizante y se relaciona con la presencia de úlcera péptica y cáncer gástrico, en cambio las cepas con el genotipo s2/m2/i2 en la mucosa gástrica no presenta cambios inflamatorios agudos (Olivares & Gisbert, 2006)(Suárez, Reyes, & Herreros, 2011) (González & Rodríguez, 2011)

#### **2.2.4.5 CagA (cytotoxin-associated gene A)**

La isla de patogenicidad *cag* de *H. pylori* (*cag* PAI) es un conjunto de genes que codifican para un sistema de secreción tipo IV (T4SS), además no se expresan constitutivamente hacia el interior de las células epiteliales y no existen homólogos del mismo en otras especies de *Helicobacter* (Alzahrani, 2014). El CagA (gen A asociado a la citotoxina) es una proteína que interactúa con la tirosin-fosfatasa (SHP-2), codificado por el gen *cagA*, activándose diversas cascadas de señalización, produciendo diversos factores proinflamatorios como IL-8 que provoca daño epitelial, cambios en el citoesqueleto debido a la elongación y proliferación celular, otro efecto es la pérdida de polaridad celular, asociándole al desarrollo de cáncer gástrico, siendo un factor importante de riesgo (Nicole et al., 2009) (González & Rodríguez, 2011).

#### **2.2.4.6 LPS (lipopolisacárido)**

Está conformado por el Polisacárido O (antígeno O) en el que se destaca la expresión de los antígenos de Lewis que incluyen Lewis B, Lewis X y Lewis Y; el oligosacárido central y el lípido A (endotoxina A) que al interactuar la bacteria con el huésped su respuesta inmune disminuye (Barragan et al., 2015). Esta respuesta inmunológica baja logra que la infección por *H. pylori* persista por más tiempo en relación a infecciones más agresivas (Olivares & Gisbert, 2006).

El lipopolisacárido de *H. pylori* le otorga mimetismo a la bacteria, evade la respuesta inmune durante infecciones de largo plazo como también participa en la colonización y

adhesión de la misma al huésped (Barragan et al., 2015). Por tanto, el LPS de *H. pylori* permite la unión con la membrana basal del epitelio gástrico, afectando la integridad de la mucosa gástrica debido a que disminuye la actividad del pepsinógeno 1, es así que la pepsina por su alta capacidad mucolítica/proteolítica produce las úlceras pépticas (Olivares & Gisbert, 2006) (Solnick & Schauer, 2001).

#### **2.2.4.7 Flagelos**

*Helicobacter pylori* presenta de 4 a 8 flagelos polares, recubiertos por una vaina de lipoproteínas que los protege del medio ácido del estómago (Ramírez Ramos & Sánchez Sánchez, 2008). El flagelo contiene dos proteínas llamadas flagelinas FlaA y FlaB. Las cuales le facilitan la motilidad de la bacteria para la colonización a través de la mucosa gástrica y poder protegerse del ácido gástrico (Olivares & Gisbert, 2006). La eliminación o mutación de estas flagelinas (FlaA / FlaB) da lugar a bacterias no móviles con incapacidad de colonizar la cavidad estomacal (Torres & Rodríguez, 2008) (Olivares & Gisbert, 2006).

#### **2.2.5 Aspectos clínicos**

*Helicobacter pylori* es una bacteria patógena que coloniza el estómago causando patologías tales como gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico (Henao et al., 2009). Esto se puede evidenciar cuando la bacteria causa daño al epitelio gástrico o proceso de inflamación crónica que se vuelve irreversible dañando la mucosa gástrica (Suárez, Reyes, & Herreros, 2011).

Cuando la infección se encuentra avanzada empiezan a presentar daños a nivel gástrico y aparece la sintomatología gástricas como distensión abdominal, meteorismo, náuseas, vómito entre otros (Ramírez & Quintanilla, 2007). Si el microorganismo no se erradica adecuadamente, la respuesta inicial aguda se vuelve severa que sigue lesionando el epitelio gástrico provocando un proceso crónico (Suárez et al., 2011).

##### **2.2.5.1 Gastritis crónica**

Es una inflamación crónica de la mucosa gástrica donde se genera atrofia leve, grave e incluso puede desarrollar adenocarcinoma (Suárez et al., 2011).

La infección causada por *Helicobacter pylori* presenta dos fases: aguda y crónica.

Fase aguda; Se caracteriza por presentar una alta proliferación bacteriana como alta inflamación del epitelio y mucosa gástrica, la sintomatología se vuelve inespecífica, se desarrolla la hipoclorhidria. Por otro lado, la respuesta inmune empieza a producirse después de semanas iniciada la infección y la presencia de la bacteria en las heces es alta (Harris, Godoy, & Guiraldes, 2001).

Fase crónica: Se caracteriza por una disminución de la inflamación del epitelio hasta volverse una gastritis superficial crónica difusa, la respuesta inmune se vuelve ineficaz para combatir la bacteria, la persona infectada se vuelve asintomática y puede permanecer así por varios años (Gámez Escalona, Mulet Pérez, Miranda Moles, & Mulet Gámez, 2007). En algunos casos ciertos pacientes pueden desarrollar complicaciones como úlceras pépticas y adenocarcinoma. Sin embargo la bacteria en la gastritis crónica tiende a ubicarse la lesión del epitelio comúnmente en el antro (Harris et al., 2001) (Suárez et al., 2011). Finalmente la relación de la gastritis con la presencia de *H. pylori* es de un 100% (Naranjo et al., 2012).

#### **2.2.5.2 Úlcera péptica**

Es una lesión en la mucosa que recubre el tubo digestivo localizada en el estómago o la primera porción del duodeno. Actualmente se le asocia a la presencia de *Helicobacter pylori* o el consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Moreira & Lopez, 2004) (Suárez et al., 2011).

Úlcera gástrica: Lesiones en el epitelio en el área prepilórica o se asocian a las úlceras duodenales, la secreción del ácido tiende a ser normal o baja, se presentan alteraciones en el esfínter pilórico lo que aumenta el reflujo gástrico duodenal en algunos pacientes (Naranjo et al., 2012)

Úlcera duodenal: Presencia de ulceraciones en el duodeno, existe una alteración en la secreción del ácido la cual se incrementa al igual que el vaciamiento gástrico. Se encuentra asociada principalmente a la presencia de *H. pylori* en la mucosa antral, su sintomatología es inespecífica (Naranjo et al., 2012) (Suárez et al., 2011).

El daño que cause la úlcera a nivel del estómago o duodeno depende de la cepa y virulencia; además sino se trata adecuadamente, causa complicaciones como hemorragias digestivas, dispepsias entre otras; por tanto, esta patología disminuye cuando se erradica la bacteria (Harris et al., 2001) (Naranjo et al., 2012)

### **2.2.5.3 Linfoma de Tejido Linfático Asociado a Mucosas (MALT)**

Histológicamente son linfomas no Hodgking que se localizan en la mucosa del tracto digestivo, se asocia generalmente a la presencia de infección por *H. pylori* estimulada por la presencia de las cepas de gen *CagA* que activa a los linfocitos B al unirse a la tirocin-sinasa provocando el desarrollo del tejido linfoideo formando acúmulos de linfocitos B (Suárez et al., 2011) (Harris et al., 2001).

Existe una relación entre los pacientes con gastritis crónica con *H. pylori* y el linfoma tipo MALT, dado que existe una regresión en un 75% después de la erradicación del microorganismo para formar estos linfomas (Suárez et al., 2011) (Harris et al., 2001) (Naranjo et al., 2012).

### **2.2.5.4 Cáncer gástrico**

Una de las enfermedades más comunes a nivel mundial es el cáncer gástrico, y las personas infectas con *H. pylori* presentan mayor riesgo de desarrollarlo. La asociación entre la gastritis crónica y el adenocarcinoma gástrico se evidencia desde las últimas décadas. La Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) declararon a *Helicobacter pylori* como una bacteria carcinógena tipo I; sin embargo, no todas las afecciones donde el microorganismo está presente desarrollan cáncer ya que se deben considerar el gen de la cepa bacteriana como la susceptibilidad del paciente y la incidencia de cáncer gástrico en el país (Suárez et al., 2011) (Harris et al., 2001).

El desarrollo de esta patología presenta cambios secuenciales de la mucosa gástrica iniciando desde una gastritis aguda que progresa a gastritis crónica multifocal atrófica con hipoclorhidria, presencia de metaplasia y displasia intestinal hasta la formación del cáncer, y no solo se ubica en la región antral del estómago sino que es de variante intestinal (Naranjo et al., 2012) (Suárez et al., 2011).

Aunque se realice la erradicación del microorganismo si el paciente presenta predisposición puede producirse el cáncer debido a que existe una progresión de lesiones precancerosas, que inicialmente no pueden ser identificadas a nivel endoscópico (Naranjo et al., 2012).

Existen dos tipos de adenocarcinoma gástrico:

Adenocarcinoma tipo Intestinal: Es el más frecuente, puede iniciar en la infancia y el periodo de latencia es largo lo cual impide su diagnóstico temprano y clínicamente se lo puede detectar en la etapa adulta. Presenta varios eventos secuenciales desde una gastritis crónica activa, a una gastritis atrófica multifocal. Presente de una metaplasia intestinal, displasia y carcinoma invasivo (Ramos & Sánchez, 2008)

Adenocarcinoma tipo difuso: puede ser por infección con *Helicobacter pylori*. Se caracteriza porque no presente una lesión pre-cancerosa no definida (Ramos & Sánchez, 2008)

### **2.2.6 Diagnóstico de *H. pylori***

La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* ha aumentado mundialmente y varía según la edad, raza, zona geográfica, estado socioeconómico, y desde sus primeros hallazgos a partir de biopsias gástricas se ha desarrollado varios métodos para la detección de la bacteria (J. I. Moncayo et al., 2006) (Patel et al., 2014).

El diagnóstico para la infección de *H. pylori* ha desarrollado diversos métodos, según la técnica usada se clasifican en invasivas o directas y no invasivas o indirectas (Martín, Argila, & Boixeda, 2001). Todas las pruebas presentan ventajas y desventajas en su uso e identificación del microorganismo, sin embargo no se puede considerar a una sola como el estándar de oro (Patel et al., 2014). No obstante, la combinación de más de una prueba suelen dar un diagnóstico más satisfactorio, siendo así el uso de las pruebas invasivas para propósitos clínicos y las no invasivas para fines epidemiológicos (González F, Serrano H, & Harris D, 2007).

A pesar de las altas tasas de prevalencias, el diagnóstico en los niños es más difícil en relación al adulto; de este modo, en un consenso según el método RAND/UCLA, establecieron que la endoscopia esófago-gastroduodenal (EGD) no es conveniente para todos los niños con dispepsia, sólo estaría indicada en los casos con antecedentes familiares de úlcera péptica y/o la infección por *Helicobacter pylori* (Molano, Piñeros, & López, 2008) (Alonso, Ruiz, & Riveros, 2014), en niños mayores de 10 años, con síntomas que persisten por más de 6 meses y lo suficientemente severos como para afectar las actividades de la vida diaria (Gilger, 2005).

En caso de sospecha de presencia del *Helicobacter pylori*, el diagnóstico puede hacerse a través de métodos no invasivos indoloros y de fácil uso para la población pediátrica, obteniendo rendimientos similares (Kodaira, Escobar, & Grisi, 2002) (González F et al., 2007).

En cambio, las Guías de la Sociedad Americana de Endoscopía Digestiva (ASGE), el



Grupo Europeo para el estudio del *Helicobacter pylori* (EHSg) y la Asociación Americana de Gastroenterología (AGA) recomiendan que la endoscopia debería ser reservada para pacientes con signos de dispepsia, individuos positivos a *Helicobacter pylori* que falló el tratamiento, pacientes mayores de 45 años y en menores de 45 años con síntomas gástricos frecuentes y fuertes (Uehara et al., 2007)

### **2.2.6.1 Técnicas invasivas**

#### **2.2.6.1.1 Prueba rápida de la ureasa**

*Helicobacter pylori* se caracteriza por producir ureasa la cual hidroliza la urea en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y amoníaco (NH<sub>3</sub>) (J. Moncayo et al., 2011). La detección de la enzima se la realiza mediante una prueba cualitativa que va a detectar la enzima ureasa mediante una biopsia gástrica donde la liberación de amoniaco cambia de pH y se lo detecta por el cambio de color (Patel et al., 2014)

Los primeros kits que utilizaron CLO test de Kimberly-Clark y Pylori tek de Serim (Kimberly-Clark, 2006)(Serim, 2012) se basan en realizar mediante una tira de reactivo verificar el cambio de color debido a que la biopsia gástrica tiene actividad de la enzima ureasa por lo que hidroliza urea para formar iones y aumentar el pH produciendo el cambio de color.

Estos tests tienen una sensibilidad y especificidad superior al 90% y los resultados se obtiene mayor a las 24 horas y dependen de densidad bacteriana (Patel et al., 2014) (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

Hoy en día existen otros kits comerciales como la prueba de ureasa o RUT que usa como indicador un pH quimioluminiscente para obtener un resultado inmediato incluso se la puede realizar por vía endoscópica usando pH biosensor que da el resultado en un minuto con una sensibilidad de 92% y especificidad del 95% (Patel et al., 2014). La especificidad alta se debe a que las bacterias diferentes a *H. pylori* son escasas o nulas en la parte gástrica, además es rápido de bajo costo y se usa fácilmente en pacientes que se someten a endoscopias; en cambio la sensibilidad es menor por el consumo de antibióticos (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008)

#### **2.2.6.1.2 Histología**

La bacteria fue detectada por primera vez mediante cortes histológicos los cual permiten observar su presencia y la reacción inflamatoria del tejido, la lectura de estos corte se realiza mediante el uso de tinciones como Giemsa la más común, debido a que es fácil de realizar,

económica; otras tinciones como hematoxilina-eosina, de Warthin-Starry con nitrato de plata (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008) estas últimas ayudan a evaluar el nivel de inflamación junto con la colonización de la bacteria (Patel et al., 2014).

La finalidad del análisis histológico es determinar el nivel del daño del tejido y observar la presencia del microorganismo *H. pylori*. La sensibilidad y especificidad de la técnica es del 90% y 95% respectivamente, los resultados se obtienen a partir del 3 día. Sin embargo en la detección de la bacteria este método presenta algunas desventajas para su sensibilidad que son: la densidad, distribución no uniforme en el tejido gástrico del microorganismo, el número y tamaño de la biopsia, tinción que se emplee como la experiencia del analista (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

Otros métodos complementarios para detectar *H. pylori* a partir del tejido son la inmunohistoquímica y técnica de FISH (fluorescent *in situ* hybridization), esta última presenta un 98 % de sensibilidad y 100 % de especificidad, el tiempo de respuesta para detectar al microorganismo es aproximadamente 3 horas mayor al método histológico convencional, aunque lo complicado son los costos y el uso de microscopios de fluorescencia, oligonucleótidos fluorescentes específicos que identifican los genes pertenecientes al 16S RNAr y 23S RNAr (Patel et al., 2014) (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

#### **2.2.6.1.3 Cultivo**

*Helicobacter pylori* se puede aislar mediante el cultivo microbiológico, una técnica del 100% de especificidad, pero depende del medio que se utilice para su aislamiento (Majalca-Martínez et al., 2001). Los medios que tiene mejor resultados en el aislamiento del microorganismo son el Agar Casman, agar Columbia y agar Brucella, los cuales debe estar suplementado con 7% al 10% de sangre de caballo, cordero junto con antibióticos (vancomicina, anfotericina B o polimixina B, trimetoprim, cefsulodina), la conservación de estos medios debe ser a 4°C no por más de 20 días (Majalca-Martínez et al., 2001). La bacteria debe ser cultivada en ambiente microaerófilo de 5% -10% de CO<sub>2</sub>, 80% -90% de N<sub>2</sub> y 5% -10% de O<sub>2</sub>, temperatura de 37°C de 5-10 días, aunque otros autores recomiendan que la incubación sea hasta 15 días (Majalca-Martínez et al., 2001) (Bayona, 2013). A nivel del laboratorio el medio más usado es el agar Columbia con 7% de sangre de cordero desfibrinada y suplemento DENT (vancomicina, anfotericina B, trimetoprim, cefsulodina) para obtener cepas de

*Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas, con una especificidad alta (Bayona, 2013) (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

La identificación de la bacteria se lo realiza mediante la morfología de la colonia que son colonias pequeñas, translúcidas, brillantes de aproximadamente 1mm de diámetro, tinción Gram para observar bacilos gram-negativos espiralados, además da positivo para ureasa, catalasa, oxidasa, incluso se la identifica porque es sensible a cefalotina y resistente al ácido nalidíxico (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008) (Majalca-Martínez et al., 2001).

La sensibilidad de esta técnica se encuentra afectada por las condiciones que se deben considerar para el crecimiento del microorganismo, por tanto se debe tomar en cuenta el transporte, almacenamiento de la muestra, medio de cultivo y la condiciones para incubar. Incluso se debe considerar la cantidad de biopsias que debe ser de 2 a 5 muestras por la distribución no uniforme del microorganismo en el tejido gástrico y la experiencia del analista (Bayona, 2013) (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008). Siendo así que la sensibilidad de esta técnica es de aproximadamente del 77% al 94% considerando que la recuperación del microorganismo es a partir del 30% al 70% de biopsias altamente infectadas (Majalca-Martínez et al., 2001) (Henao et al., 2009).

La finalidad del cultivo microbiológico es la identificación del microorganismo y la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos utilizados en el tratamiento de *H. pylori*, y a través de esta técnica se puede obtener cepas puras las cuales pueden ser usadas para otros procedimientos como la obtención de antígenos específicos o en métodos moleculares (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

#### **2.2.6.1.4 Técnicas moleculares**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar el ácido desoxirribonucleico (ADN) de *H. pylori* y la caracterización de genes y mutaciones específicas asociadas a la resistencia a antibióticos a partir de biopsias gástricas, de cepas aisladas en concentraciones mínimas (Patel et al., 2014).

Los genes utilizados para detectar *H. pylori* son gen *ureA*, gen *glmM* o *ureC*, genes que codifican 16S RNAr, 23S RNAr y *Hsp60*. Otros genes patógenos como *cagA*, *vacA*. El gen *glmM* ha sido empleado para la detección de *H. pylori* con una alta sensibilidad y especificidad (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008)

Sin embargo la mayoría de métodos basados en PCR tiene una sensibilidad del 100%, se puede realizar su análisis a través de diversas muestras como directo de la biopsia gástrica, material incrustado en parafina como también de cepas aisladas. No obstante la extracción de ADN y la sensibilidad del método se pueden alterar debido a la distribución desigual del microorganismo en el tejido (alta, mínima o nula colonización), presencia de lípidos u otros componentes que inhiben la reacción de PCR que puede dar falsos negativos (Patel et al., 2014) (Bermúdez, Torres, & Rodriguez, 2008).

A pesar de lo anterior mencionado la sensibilidad y especificidad de la técnica molecular sigue siendo alta y hay diferentes como por ejemplo PCR convencional, PCR-RFLP, PCR en tiempo real entre otros; dependiendo de la técnica que se use tiene ventaja al cuantificar y detectar *H. pylori*, ya que lo pueden detectar en ambas formas morfológicas como también permiten analizar las mutaciones como respuesta a la resistencia de antimicrobianos detectando los fallos terapéuticos, se la puede utilizar para identificar la diversidad genética (Bermúdez, Torres, & Rodriguez, 2008) (Patel et al., 2014).

#### **2.2.6.2 Técnicas no invasivas**

##### **2.2.6.2.1 Prueba del aliento**

La prueba del aliento se basa también en la actividad de la ureasa de *H. pylori*, pero en este caso con urea marcada. Como resultado de la ingestión de una suspensión de urea marcada con  $C^{13}$  o  $C^{14}$ , ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento. La cantidad de  $CO_2$  marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *H. pylori* (Patel et al., 2014). La prueba del aliento es un método cualitativo que, a diferencia de la prueba de la ureasa rápida, estudia toda la superficie del estómago, son muy altas su sensibilidad y especificidad, tanto en pacientes que no han sido tratados previamente, como en aquellos que sí han recibido un tratamiento erradicador. También es considerada la más fidedigna de las técnicas no invasivas en contraste con otros métodos indirectos, como la serología, cuando su resultado es positivo indica infección actual (Bermúdez, Torres, & Rodriguez, 2008).

#### **2.2.6.2.2 Serología**

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos de clases IgG o IgA contra antígenos específicos de este microorganismo. Las técnicas más empleadas para la detección de anticuerpos son: ensayo inmunoenzimático de enzima ligada (ELISA), aglutinación en látex, inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting) e inmunocromatografías (ICM) (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008) (Patel et al., 2014).

La técnica más empleada, es el ELISA estándar y sus variantes. Son muchos los juegos comerciales basados en esta técnica, gran parte de los cuales contienen mezclas de antígenos específicos de *H. pylori*, con lo cual se ha disminuido la reactividad inespecífica, y por tanto se ha aumentado la especificidad de los ensayos hasta un 98% (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008).

Los inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting), como el Western Blot, son muy útiles para evaluar la respuesta inmune contra antígenos específicos, como VacA y CagA, lo que permite establecer relaciones entre el desarrollo de patologías más severas y la presencia de determinados antígenos de *H. pylori* (Patel et al., 2014).

La limitación principal de la serología es su incapacidad para distinguir entre la infección activa y una infección previa con *H. pylori*, ya que los niveles de anticuerpos persisten alrededor de 6 meses en sangre y esto puede determinar la obtención de falsos positivos. Por otra parte, dada la heterogeneidad de las cepas que circulan en las diferentes zonas geográficas y las variaciones en las preparaciones antigénicas de los diferentes juegos serológicos comerciales, es necesario validar cada juego comercial en la población particular donde se pretenda hacer extensivo su empleo (Bermúdez, Torres, & Rodríguez, 2008)

#### **2.2.6.2.3 Detección de antígenos en heces fecales**

La detección de antígenos de *H. pylori* en heces fecales, mediante técnicas inmunoenzimáticas, se ha empleado para el diagnóstico inicial de la bacteria y para confirmar la erradicación de la misma después del tratamiento (Javier Gisbert, Del Mar Cabrera, & Pajares, 2002). La primera prueba comercial desarrollada fue Premier Platinum HpSATM

(Meridian Diagnostics), que constaba de una mezcla de anticuerpos policlonales para el reconocimiento de los antígenos y aunque su sensibilidad era buena, la especificidad no era suficiente (Patel et al., 2014). Estas pruebas han sido sustituidas por otros que contienen anticuerpos monoclonales, los cuales muestran una muy buena especificidad. Esta técnica tiene la ventaja de ser totalmente no invasiva y por tanto muy útil para el diagnóstico de la infección en pacientes de cualquier edad, sobretudo en niños (Javier Gisbert et al., 2002) (Patel et al., 2014).

Las pruebas comerciales basadas en la detección de antígenos en heces fecales se ven afectados por varios elementos, entre los que se destacan: la excreción de los antígenos muy diluidos o degradados, cuando hay problemas de diarreas u obstrucciones intestinales, respectivamente; lo que compromete la sensibilidad de estas pruebas. Otro aspecto que limita su uso extensivo, son sus altos precios (Bermúdez, Torres, & Rodriguez, 2008).

### **2.2.7 Tratamiento**

En una infección crónica con *H. pylori*, la bacteria no puede ser eliminada por el sistema inmune del hospedero, por lo que, para erradicar la infección, se requiere del uso de antibióticos; desafortunadamente no existe un tratamiento ideal y la elección del mismo debe hacerse con base en los patrones de susceptibilidad locales. El tratamiento para la infección por *H. pylori* debe aplicarse después del diagnóstico clínico (Álvarez et al., 2009).

La eficacia en la erradicación de la infección depende de diversos factores, como la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos que se utilizan, la duración y cumplimiento del tratamiento por los pacientes, incluso se consideran las características de las lesiones gástricas (Pajares García et al., 2007).

En la actualidad, las recomendaciones de la terapia antibiótica para la infección por *H. pylori* se basa en diversos aspectos como la duración del tratamiento y las patologías gastroduodenales presentes. De esta manera, algunas guías como Consenso de Maastricht recomiendan la combinación de tres fármacos (un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos). Este esquema terapéutico consigue una erradicación de 70 al 90%, de acuerdo a como se realicen las combinaciones de los antibióticos, entre los más usados se encuentran

amoxicilina (AMX), tetraciclina (TC), metronidazol (MTZ) y claritromicina (CLA) (Otero Regino et al., 2009).

La asociación de los antibióticos usados en la triple terapia son la amoxicilina y claritromicina o el metronidazol y la claritromicina junto con un inhibidor de la bomba de protones. Sin embargo, cuando fracasa el tratamiento de primera línea se emplea tratamientos de rescate asociando otra combinación antibiótica de tetraciclina y metronidazol, logrando una eficacia aproximada del 80% (Pajares García et al., 2007).

Como se ha comentado anteriormente, la eficacia actual de la triple terapia estándar ha ido disminuyendo, debido a que la resistencia a los antibióticos utilizados ha aumentado dando como resultado el fracaso terapéutico (Otero Regino et al., 2009).

### **2.2.8 Resistencia a los antibióticos**

La finalidad de los antibióticos desde su descubrimiento es proteger al organismo de otros patógenos que causan diversas enfermedades infecciosas, entre estos microorganismos encontramos virus, parásitos, hongos y bacterias. Cada uno de estos microorganismos presenta mecanismo de defensa y han cambiado su genética para poder resistir y adaptarse a los cambios ambientales como a la respuesta del hospedero, desarrollado cepas resistentes como respuesta a un fenómeno evolutivo (Cabrera, Gomez, & Zuñiga, 2007)(Gracia, 2001)

Las causas de estas resistencias se originan en un control inadecuado de la administración de los mismos, por incumplimiento del tratamiento, que ocasiona que las infecciones se prolonguen sin presentar el efecto deseado, en ocasiones puede desencadenar en algo crónico o muerte (OMS, 2015)

*Helicobacter pylori*, ha desarrollado resistencia a los antibióticos que se usan en su tratamiento como a penicilinas, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas y cada una de las tasas de resistencia son variables (Pajares García et al., 2007).

Metronidazol, presenta una prevalencia de resistencia muy amplia, es así en Europa presentan una resistencia mayor a 68% y en América Latina tiene un rango del 12.5% al 95%. Otro antibiótico de uso común en la erradicación de *H. pylori* es la claritromicina que en América Latina presenta un rango de resistencia del 0% al 60% en cambio en Europa va desde

el 3% al 25%. Otros antibióticos como la amoxicilina y tetraciclina tiene una prevalencia de resistencia muy baja (Pajares García et al., 2007).

La claritromicina tiene mayor relevancia y eficacia para la erradicación de *H. pylori* que el metronidazol, sin embargo si ambos antibióticos se usan en la terapia contra *H. pylori* y presentan la resistencia se produce un fallo erradicador mayor al 90%, por lo tanto cuando se emplea por primera vez el esquema terapéutico es mejor no asociar ambos antibióticos (Pajares García et al., 2007).

### **2.2.9 Resistencia a la claritromicina en *Helicobacter pylori***

Los macrólidos son compuestos que presentan un anillo lactónico que varía desde 8 a 62 átomos, a este grupo pertenecen varios antimicrobianos, sin embargo cuando se trata de antibióticos el anillo tiene un tamaño de 14, 15 y 16 átomos que están unidos por enlaces glucosídicos a diversos desoxiazucres aaminados (Cobos-Trigueros, Ateka, Pitart, & Vila, 2009).

Los antibióticos de esta familia presentan mecanismos de resistencia adquirida como es el cambio estructural del lugar de unión del ribosoma con el macrólido, presencia de enzimas inactivantes (Cobos-Trigueros, Ateka, Pitart, & Vila, 2009).

La claritromicina, macrólido de 14 carbonos en el anillo lactónico, es el fármaco de primera elección para la erradicación de *H. pylori*, además es el más estable en medio ácido como el del estómago, su vida media es más larga que los otros macrólidos por lo que su penetración en el tejido gástrico es mayor (Fariña et al., 2007). Sin embargo, su efecto puede ser bactericida o bacteriostático dependiendo directamente de la concentración y proliferación del microorganismo como de la susceptibilidad a los antibióticos que presenten las cepas tratadas (Klesiewicz et al., 2014).

Una de las causas de la resistencia a la claritromicina se debe a que existe un consumo previo de macrólidos en otras infecciones como respiratorias o de piel, induciendo a resistencias cruzadas, por la presencia de mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr (Henao et al., 2009) (Pajares García et al., 2007)



### **2.2.9.1 Mutaciones puntuales en el 23S RNAr**

La resistencia a la claritromicina en *Helicobacter pylori* se debe a mutaciones postranscripcionales o mutación puntual situada en el dominio V peptidiltransferasa del 23S RNAr (gen *rrn*) de la subunidad ribosomal 50S (Tanih & Ndip, 2013) (Klesiewicz et al., 2014) (Cobos-Trigueros, Ateka, Pitart, & Vila, 2009), la unión del macrólido al ribosoma se encuentra afectado por modificación del sitio activo porque impide la translocación del aminoacil-RNAr, factor de elongación EF-Tu, GTP del sitio A al P del ribosoma, interfiriendo con la etapa de elongación de la síntesis proteica y una disminución en la fijación, es decir que afecta la unión pero no la síntesis de proteínas (Mégraud & Corti, 2009), además las mutaciones que se presenta son espontáneas, indica que se da una sustitución de adenina por citosina o guanina en la posición 2142 (A2142C, A2142G), o adenina por guanina en la posición 2143 (A2143G); otras sustituciones son A2115G, G2141A, T2182C (Castro & Vargas, 2009) (Picoli et al., 2014) (Mégraud & Corti, 2009) T2243C, C2245T, G2244A, A2146G, A2147G, A2115G, T2289C son menos frecuentes (Nishizawa & Suzuki, 2014)(Wu et al., 2014)(González C et al., 2001)

*Helicobacter pylori* tiene dos copias del RNAr, las cepas resistentes pueden presentar heterogeneidad del 23S RNAr o la presencia de un 23S RNAr mutado junto a un tipo silvestre, ambos puntos de mutación en el dominio V del 23S RNAr confieren un fenotipo bacteriano de resistencia a la claritromicina (Versalovic et al., 1996) (Nishizawa & Suzuki, 2014)

### **2.2.10 Detección de la resistencia a la claritromicina**

#### **2.2.10.1 Prueba Épsilon (E-test)**

Es un método que evalúa la susceptibilidad antimicrobiana, se basa en usar una tirilla plástica impermeable que presentan impregnación de gradiente logarítmico del antibiótico a evaluar y en un lado de la tirilla presenta una escala de lectura que corresponden a 15 diluciones dobles que corresponde a concentración mínima inhibitoria clínicamente importantes (Jaramillo, 1998)

A nivel del área clínica es importante determinar la sensibilidad de los antibióticos a través de pruebas de susceptibilidad en cultivo microbiológico como dilución de agar (DA), tirilla de gradiente (E-test), o difusión en disco, del cual según el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) el método de referencia es la dilución en agar. Sin embargo, debido a que su

procesamiento es muy largo y complejo no se aplica a la rutina del área de microbiología (Ávila et al., 2009). Estudios han demostrado que la prueba épsilon o tirilla de gradiente (E-test), tiene una sensibilidad del 99% y especificidad del 98% para pruebas de susceptibilidad con los antibióticos que se usan en el esquema de erradicación, además esta técnica en comparación con la de dilución en agar permite obtener lecturas directas de concentraciones mínimas inhibitorias sin realizar varios inóculos y diluciones, siendo una técnica que se puede realizar fácilmente en el laboratorio de rutina (Arévalo et al., 2008).

La aplicación e interpretación de la técnica de gradiente para detectar la susceptibilidad a la claritromicina se basa en los puntos de cortes que constan en EUCAST para indicar si es sensible, intermedio o resistente al antibiótico en estudio (Arévalo et al., 2008) (Ávila et al., 2009).

#### **2.2.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite amplificar una o varias partes del ADN *in vitro* para obtener una secuencia de interés clínico. Presenta una sensibilidad de un 98% y especificidad del 100% para identificar alteraciones o mutaciones genéticas de microorganismos (Premoli, González, Millán-Mendoza, Percoco, & Vielma, 2004), por tanto el uso de estas técnicas son de utilidad para identificar microorganismos difíciles de cultivar o muy poco comunes en la rutina del laboratorio como es el caso *H. pylori* (J. I. Moncayo et al., 2006).

La presencia de métodos moleculares para la detección de *H. pylori* se lo puede realizar a través de muestra invasivas como biopsias gástricas o no invasivas como placas dentales, heces entre otros. Las pruebas de PCR ayudan a identificar la bacteria mediante el uso de secuencias de nucleótidos, del mismo modo permite identificar si existen mecanismo de resistencia por la presencia de mutaciones puntuales (Vallejos, Cerda, Valenzuela, & Toledo, 2003) (Premoli et al., 2004).

La claritromicina que es uno de los antibióticos de primera línea en el esquema de erradicación del microorganismo, cuando se presenta resistencia es una de las principales causas del fallo terapéutico, por tanto es necesario realizar un análisis de la secuencia del 23S RNAr gen *rrn* para identificar si presenta mutaciones puntuales y el tipo de mutación (A2142G

y A2143G) para asociarle con el nivel de resistencia y ayudar al clínico a la toma de decisiones para el esquema terapéutico en la erradicación del microorganismo (Vallejos et al., 2003) (Ávila et al., 2009) (Acosta et al., 2013).

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Claritromicina:** macrólido con un anillo lactónico conformado por 14 átomos unidos por enlaces glucosídicos a diversos desoxiazúcares aaminados (Cobos-Trigueros, Ateka, Pitart, & Vila, 2009)

**Concentración mínima inhibitoria (MIC):** es la concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento visible del microorganismo después de la incubación a 37°C, se expresa en µg/ml (Horna & Silva, 2005)

**E-test (prueba épsilon):** método que evalúa la susceptibilidad a antibióticos usando una tirilla plástica impermeable con impregnación del antibiótico mediante un gradiente logarítmico, a un lado de la tirilla presenta una escala de lectura de 15 diluciones dobles que corresponde a niveles de concentración mínima inhibitoria clínicamente importantes (Jaramillo, 1998)

***Helicobacter pylori*:** bacilo gram negativo curvo o en forma de “S”, microaerófilo, que posee de 4 a 8 flagelos polares, tiene una membrana externa, un tamaño de 2,4 – 0,4 µm de largo y 0,5 – 1,0 µm de ancho (Morris, 2000).

**Microaerófilo:** microorganismo que necesita oxígeno libre para crecer, el mismo que debe encontrarse a una concentración inferior a la que se encuentra en la atmósfera (ONSALUS, 2015).

**Mutación puntual:** son mutaciones causadas por sustitución, adición o eliminación de nucleótidos dentro de una sección o gen de ADN o ARN, algunas pueden hacerse visibles a nivel fenotípico y otras detectadas a nivel molecular (Barahona & Piñero, 1994).

**Pirimidina:** compuesto orgánico formado por el anillo pirimidínico que contiene cuatro carbonos y dos nitrógenos, tiene tres derivados que forman parte de los ácidos nucleicos: timina (T), citosina (C) y uracilo (U), las dos primeras forman parte del ADN y la última está presente en el ARN (Burriel, 2008).

**Purinas:** se basan en el anillo purínico, compuesto por dos anillos fusionados que contiene cinco carbonos y cuatro nitrógenos, son heterocíclicos aromáticas que forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos (ADN, ARN). Son adenina (A) y guanina (G) (Burriel, 2008).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** es una técnica que permite obtener y amplificar varias cantidades de ADN *in vitro* a partir de muestras pequeñas (Premoli, González, Millán, Percoco, & Vielma, 2004).

**Resistencia a antibióticos:** se refiere a la resistencia de una bacteria a un fármaco al que inicialmente era susceptible por intercambio de características de resistencia o alteración en su estructura genética (OMS, 2015).

**Secuenciación:** es un procedimiento mediante el cual se va a determinar la secuencia de nucleótidos específica de ADN o de un fragmento del ácido nucleico (Boto, 2010).

**Transición:** es un tipo de mutación puntual que se realiza de manera espontánea, sustituyendo las bases nitrogenadas como es una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina (Muller-Esterl, 2008) (UCV, 2010).

**Transversión:** es una mutación que se realiza de manera espontánea, se sustituye una base por otra bases, como es una purina por una pirimidina o una pirimidina con una purina (Muller-Esterl, 2008) (UCV, 2010).

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

El presente estudio, se deriva como parte del proyecto de investigación L13295 “*H. pylori*, mutaciones génicas, resistencia a los antimicrobianos y posible fallo terapéutico” desarrollado en la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, financiado por la misma.

#### 3.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional descriptivo transversal, ya que se pretende conocer la resistencia a la claritromicina en cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de biopsias gástricas obtenidas durante un periodo específico, a través del uso de técnicas fenotípicas y el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramientas molecular para identificar mutaciones en el 23S RNAr.

#### 3.2 Población de estudio y muestra

Se utilizaron biopsias gástricas como muestra principal provenientes de pacientes que acuden al área de Gastroenterología de Hospital Eugenio Espejo, Hospital de las Fuerzas Armadas N°1 durante el periodo julio – diciembre 2015, las cuales fueron transportadas para su procesamiento fenotípico al Instituto de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (INSPI-Quito). Para la selección de las muestras se utilizó un Muestreo Simple Aleatorio (MSA), (Explorable.com, 2009) a partir de los registros de los pacientes a los que se le realiza endoscopia y biopsia, según los criterios de inclusión y exclusión como se detallan.

#### 3.3 Criterios de inclusión

- ✓ Paciente mayores de 18 años que van a ser sometidos a endoscopia digestiva
- ✓ Pacientes que hayan sido informados del propósito de estudio, han aceptado y firmado el consentimiento informado
- ✓ Muestras que presenten crecimiento en cultivo microbiológico de *Helicobacter pylori*

### 3.4 Criterios de exclusión

- ✓ Pacientes menores de 18 años que son sometidos a endoscopia digestiva
- ✓ Pacientes que hayan consumido antibióticos e inhibidores de protones previo a la intervención (3-5 días).
- ✓ Pacientes que se encuentren gastrectomizados, presenten hemorragias digestivas.
- ✓ Pacientes que no firmen el consentimiento informado referente a la investigación.

### 3.5 Tamaño de la muestra

Se realizó el estudio dentro de la población determinada en el proyecto de investigación L13295 “*H. pylori*, mutaciones génicas, resistencia a los antimicrobianos y posible fallo terapéutico”, el cual determinó que es una población finita debido a que mensualmente asisten a la consulta externa de gastroenterología del Hospital Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas N°1. Se calculó tomando en cuenta que acuden aproximadamente 800 pacientes/mes a realizarse endoscopias digestivas, teniendo un universo total de 4800 en 6 meses del estudio.

### FÓRMULA

$$n = \frac{N[Z_{(1-\alpha)}]^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + [Z_{(1-\alpha)}]^2 * p * q}$$

DATOS		
Muestra	N	?
Error alfa	A	0,05
Nivel de confianza	1-α	95%
Z (1-α)	Z (1-α)	1,96
Prevalencia	*P	0,095
Complemento de p	Q	0,905
Población	N	4800
Precisión	D	0,04

\*p: La prevalencia de resistencia a la claritromicina de *Helicobacter pylori* es de 9.5% en un estudio realizado en Guayaquil en el año del 2003 (Debets, Reyes, Mulder, Peters, & Savelkoul, 2003)

$$n = \frac{4800[1.96]^2 * 0.095 * 0.905}{0.04^2 * (4800 - 1) + [1.96]^2 * 0.095 * 0.905}$$

$$n = \frac{4800 (3.8416) * 0.0859}{0.0016 * (4799) + (3.8416) * 0.0859}$$

$$n = \frac{1585.35}{8.01}$$

$$n = 197.95$$

$$n \approx 198$$

Para encontrar cepas de *Helicobacter pylori* en pacientes sintomáticos en los dos hospitales con el nivel de confianza del 95% y un error del 5%, se obtuvo un tamaño muestral mínimo necesario en estudios descriptivos aproximadamente de 198 pacientes adultos mayores.

En la práctica, por múltiples razones, durante el transcurso de la investigación pueden existir pérdidas de los sujetos previstos a ser incluidos en el estudio, tomando en cuenta este importante aspecto, decidimos tomar un incremento de un 6% del tamaño muestral calculado, lo que es equivalente a tomar 210 pacientes del total de la población.

### 3.6 MATERIALES Y REACTIVOS

REACTIVOS	
Columbia Blood Agar	OXOID
Mueller Hinton Agar	OXOID
Brain Heart Infusion Agar	OXOID
CampyGen 2,5L Sachet	OXOID CN0025
DENT <i>Helicobacter pylori</i> selective supplement	OXOID (ANEXO I)
Oxidasa	HARDY DIAGNOSTIC
Clarithromycin MIC Test Strip	LIOFILCHEM DIAGNOSTIC
Coloración GRAM	Cristal violeta, Lugol, Alcohol-Cetona, Safranina



Agua destilada	
Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
Glicerol	
Solución salina 0,9%	
TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) 40X	PROMEGA
Agarosa	PROMEGA
Ladder 100pb	PROMEGA
GoTaq Green Master Mix 2X	PROMEGA
Syber gel stain	PROMEGA
Kit extracción DNA Genomic DNA Purification Kit	WIZARD – PROMEGA (ANEXO II)
Kit de purificación DNA SV Gel and PCR Clean-Up System	WIZARD – PROMEGA (ANEXO II)
Primers gen 23S RNAr	PROMEGA

<b>MATERIALES</b>	
Cajas petri	
Portaobjetos	
Hisopos estériles	PURITAN
Puntas desechables con filtro 10µl -100 µl -500µl - 1000µl	AXYGEN
Pipetas de 0,5 -10µL; 20 -200µL; 100-1000µl	BIOPETTE
Tubos eppendorf 1,5mL	
Gradilla	

Asas	
Pinzas	
Bisturís N°21	
Tubos 0,2mL (PCR)	
Mechero bunsen	

EQUIPO	
Gel Doc XR (Fotodocumentador)	BIO-RAD
Termociclador Mastercycler gradient	EPPENDORF
Microscopio óptico	MOTIC BA310E
Estereomicroscopio	OLYMPUS
NanoDrop 2000	THERMO SCEINTIFIC
Estufa 37°C	JOUAN EB280
Refrigerador -70°C	ILSHIN DEEP FREEZER
AnaeroJar 2,5L	AG0025A

### **3.7 PROCEDIMIENTO**

#### **3.7.1 FASE I**

##### **3.7.1.1 Aprobación del estudio y firma del consentimiento informado**

Se presentó el protocolo inicial del trabajo frente al Comité de Bioética de PUCE el cual fue aprobado, seguidamente se realizó un oficio al centro de docencia e investigación del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas N°1, también al jefe del área de gastroenterología del hospital con el fin que se apruebe la utilización de las muestras.

Consentimiento informado: el paciente firmó una autorización para usar su muestra gástrica en la investigación. ANEXO III

Ya que el contacto con el paciente es indirecto los datos serán tomados por los médicos que realizaron el procedimiento y comprobados mediante las historias clínicas.

### **3.7.1.2 Toma de muestra**

Se basó en el procedimiento endoscópico del establecimiento de salud ANEXO IV

Se requiere biopsias provenientes de:

- \* Antro: 1 de cara anterior y 1 de cara posterior: total de 2 muestras
- \* Cuerpo: 1 de cara anterior y 1 de cara posterior: total de 2 muestras (Bayona, 2013)

## **3.7.2 FASE II**

### **3.7.2.1 Transporte de las biopsias gástricas**

- \* Las biopsias obtenidas se depositaron primero en los tubos estériles que contiene solución salina al 0,9% previamente rotuladas, luego se depositarán en envases que contengan formol.
- \* Las muestras se transportaron a temperatura de 2-8°C, el tiempo es de 5 horas desde la toma de la muestra hasta su procesamiento (Bayona, 2013) (Majalca, Rivera, Ochoa, & Giono, 2001).

## **3.7.3 FASE III**

### **3.7.3.1 Sembrado de las biopsias gástricas**

- \* Las biopsias gástricas son cortadas en varios pedazos con bisturí sobre un portaobjetos completamente estéril. Luego se recoge la muestra con un asa y sembrar en Columbia Blood Agar con 7% de sangre de cordero y suplemento DENT.
- \* Posteriormente cada caja se coloca en una jarra de anaerobiosis con ambiente microaerofílico creado por el uso de Campygen (5% de CO<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>) durante 7-15 días a 37°C
- \* Para la identificación de las cepas de *H. pylori* se realizó tinción GRAM, citocromo oxidasa, producción de catalasa y producción de ureasa. ANEXO V

### **3.7.3.2 Preservación de muestras**

- \* Las cepas obtenidas luego de 7 y 15 días de incubación fueron conservados en BHI + glicerol al 20% +10% suero humano, y almacenados a -70°C. ANEXO VIII

### **3.7.4 FASE IV**

#### **3.7.4.1 Antibiógrama**

- \* En agar Mueller Hinton con 7% de sangre de cordero, se coloca 250 µl del caldo de BHI que contiene las cepas de *H. pylori* que fueron incubadas en este medio por 3-5 días, con 2 -3 McFarland (6-12 x10<sup>8</sup>UFC/ml), estriar con un hisopo estéril
- \* Se colocó las tiras de E-test de claritromicina e incubo en ambiente microaerofílico por 5-6 días a 37°C. ANEXO IX
- \* Se leyó el halo de susceptibilidad y se compararon los puntos de corte con los establecidos por el EUCAST. ANEXO X

### **3.7.5 FASE V**

#### **3.7.5.1 Amplificación del 23S RNAr, estudio de las mutaciones puntuales en cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a la claritromicina**

##### **3.7.5.1.1 Extracción de ADN de las cepas de *H. pylori***

Obtenido el análisis de susceptibilidad a la claritromicina, se escogieron 7 cepas considerando su MIC, mediante su interpretación dada por el EUCAST de sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Se realizó la extracción de ADN de estas cepas según el protocolo y especificaciones del Kit de Extracción Wizard®. ANEXO XI

##### **3.7.5.1.2 Amplificación del gen 23S RNAr**

Se amplificaron mediante PCR convencional, se usaron los siguientes cebadores K1 (5'-CCA CAG CGA TGT GGT CTC AG-3'), complementaria a la posición 2191 a 2210 y K2 (5'-CTC CAT AAG AGC CAA AGC CC-3'), complementaria a la posición 2596 a 2615, la reacción de amplificación del fragmento de 425pb sigue el protocolo detallado en el ANEXO XII

Se usó como control positivo la cepa PHPE-014 y como control negativo agua de grado biología molecular.

La amplificación del fragmento del 23S RNAr se evidenció mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 90min con 90V. Se reveló el gel y se tomó una fotografía con el fotodocumentador Gel Doc XR,

### **3.7.5.1.3 Purificación y secuenciación**

#### **3.7.5.1.3.1 Purificación**

La purificación de los productos amplificados de 425pb del gen 23S RNAr se realizó mediante el Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, siguiendo el protocolo del fabricante detallado en el ANEXO XIII.

#### **3.7.5.1.3.2 Secuenciación**

Los productos purificados fueron colocados en microtubos de 1,5 mL en un volumen de 20µL, rotulados de acuerdo la base de datos originada en excel, sellados con parafilm, empacados y enviados a la empresa MACROGEN. ANEXO XIV

Una vez obtenidos los resultados se realizó el análisis de los mismos en el programa bioinformático, MEGA 7.Ink, se ingresaron las secuencias obtenidas de las muestras, las cuales se comparó con la secuencia tipo del GenBank U27270.1, y se identificó la presencia o no de mutaciones puntuales en el 23S RNAr de *H.pylori*. ANEXO XVI

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Población de estudio

Se recogieron 210 biopsias gástricas provenientes de antro y cuerpo de cada paciente, del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo y Hospital de las Fuerzas Armadas N°1, en la que participaron 136 pacientes de género femenino y 66 del género masculino. La edad promedio es de 52 años.

**Tabla 1 Características de los datos demográficos de los muestra recogidas**

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	N	%
<b>EDAD<sup>A</sup> (AÑOS)</b>		
<30	22	10.5
30-49	65	31.0
50-69	82	39.0
70 Y MÁS	33	15.7
<b>GÉNERO<sup>B</sup></b>		
Femenino	136	64.8
Masculino	66	31.4
<b>SIN DATOS<sup>C</sup></b>	8	3.8

Los pacientes se distribuyeron en grupos de edad y según su género

<sup>A</sup> La mayor cantidad de pacientes se encuentran en el rango de edad 50-69 años

<sup>B</sup> El género más predominante en los pacientes es el femenino

<sup>C</sup> Del total de pacientes, se encontró que algunos no tenían datos o estaban incompletos.

Elaborado: Katherine Guzmán

## 4.2 Estudio histopatológico

De las 210 biopsias gástricas, se reveló que 145 pacientes (69%) son positivos para *Helicobacter pylori* mediante la tinción de hematoxilina eosina, en el que se determinó que el diagnóstico más predominante es la gastritis crónica no atrófica con 28,6% (60) pacientes, el resto de las formas diagnosticas presentaron 13,3% (28) gastritis crónica con metaplasia intestinal, 10,9% (23) gastritis crónica folicular, 1,9% (4) gastritis atrófica, 3,8% (8) gastritis crónica erosiva, 9,5% (20) gastritis crónica difusa y 1% (2) adenocarcinoma.

**Tabla 2 Presencia de *Helicobacter pylori* a nivel histopatológico y microbiológico con relación al diagnóstico anatomo-patológico.**

DIAGNÓSTICO	Presencia de <i>Helicobacter pylori</i>	
	HISTOPATOLÓGICO	CRECIMIENTO CULTIVO
Gastritis crónica no atrófica	60	15
Gastritis crónica folicular	23	23
Gastritis crónica atrófica	4	4
Gastritis crónica erosiva	8	8
Gastritis crónica difusa	20	20
Gastritis crónica con metaplasia intestinal	28	15
Adenocarcinoma	2	2
Negativo	54	0
Sin Datos	11	2
<b>TOTAL</b>	<b>210</b>	<b>89</b>

Relación del crecimiento microbiológico con la presencia de *H. pylori* en el diagnóstico histopatológico, y el cambio morfológico del tejido gástrico.

Elaborado: Katherine Guzmán

### 4.3 Cultivo

A nivel microbiológico se obtuvieron 89 pacientes positivos para *Helicobacter pylori* que corresponde al 42,4% de recuperación.

A las mismas muestras que se realizaron pruebas fenotípicas: tinción gram, oxidasa, catalasa, urea (10%) a las cuales el resultado fue del 100%.

#### 4.3.1. Relación Cultivo -Histopatológico

La concordancia entre el histopatológico y microbiológico es aceptable ( $K=0,449$ ;  $p=0,0005$ ), este resultado se debe a la toma heterogénea de las biopsias gástricas, como el transporte y manipulación en su procesamiento.

**Tabla 3 Características microbiológicas de las cepas aisladas de *H. pylori***

Microbiológico	Género		Pruebas Fenotípicas			
	Femenino	Masculino	Tinción GRAM	Oxidasa	Catalasa	Ureasa
	n/%	n/%	n	n	N	n
<b>Cepas</b>						
<i>Helicobacter pylori</i>	57/64	32/35,9	89	89	89	89

Elaborado: Katherine Guzmán

### 4.4 Antibiograma

De las 89 cepas aisladas se realizaron 78 antibiogramas usando el método de E-test se halló el 67,9% (53) cepas Resistentes, 28,2% (23) cepas Sensibles a la claritromicina y 3 cepas Intermedias. En el Grafico 3, se observa que 15 muestras de las cepas de *H. pylori* resistentes, presenta un MIC 256µg/ml.



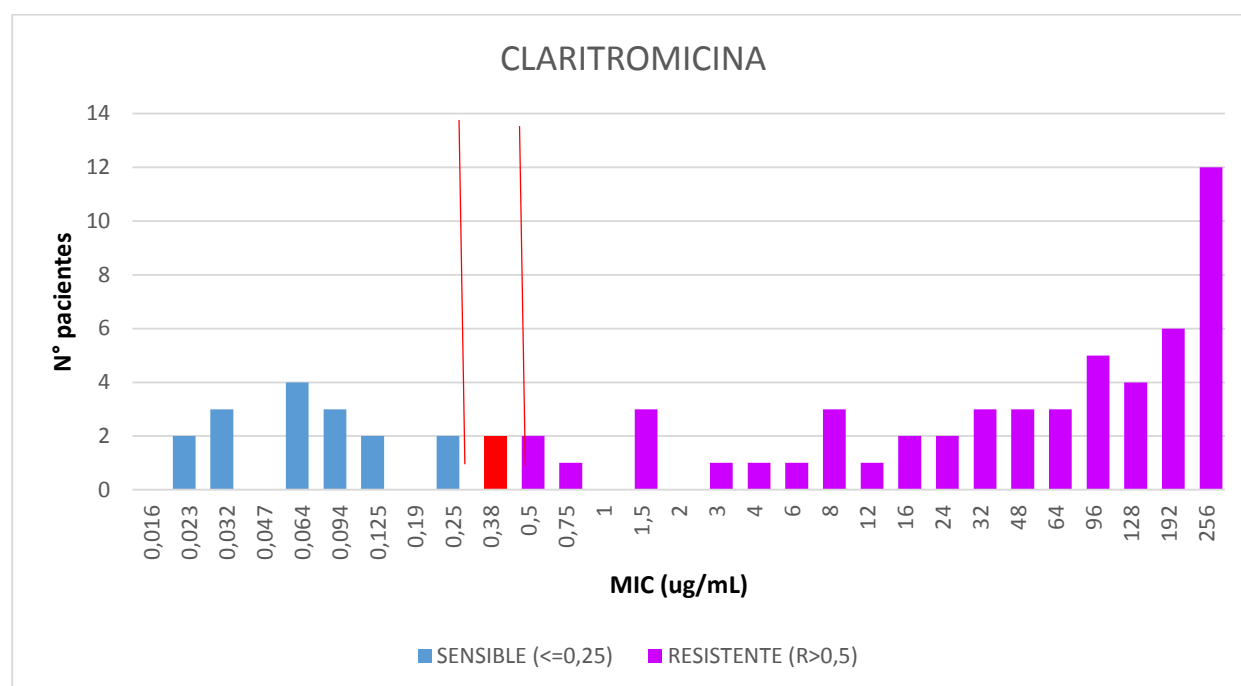
**Tabla 4 Interpretación del antibiograma realizado con MIC claritromicina**

CLARITROMICINA	N	%
SENSIBLE ( S) <sup>a</sup>	22	28,2
INTERMEDIO (I)	3	3,8
RESISTENTE (R) <sup>a</sup>	53	67,9

Las cepas aisladas de *H. pylori*, presencia de cepas Intermedias y un alto porcentaje de cepas Resistentes.

<sup>a</sup> Puntos de corte establecidos por EUCAST, 2016

Elaborado: Katherine Guzmán



**Gráfico 1 Claritromicina – MIC (0,016-256µg/mL)**

Elaborado: Katherine Guzmán

Con respecto a las enfermedades se presentaron cepas resistentes: gastritis crónica no atrófica (8,9%), gastritis crónica atrófica (3,8%), gastritis crónica folicular (19,2%), gastritis crónica difusa (17,9%), gastritis crónica erosiva (6,4%), gastritis crónica con metaplasia intestinal (8,9%), adenocarcinoma (2,5%)

**Tabla 5 Relación del diagnóstico con el perfil de susceptibilidad a la claritromicina**

DIAGNOSTICO	CLARITROMICINA		
	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
<b>GC no atrófica</b>	7	0	3
<b>GC atrófica</b>	3	0	0
<b>GC folicular</b>	15	1	7
<b>GC difusa</b>	14	1	6
<b>GC erosiva</b>	5	1	0
<b>GC metaplasia intestinal</b>	7	0	6
<b>Adenocarcinoma</b>	2	0	0

\*GC: Gastritis crónica. Puntos de corte tomados del EUCAST, 2016

Elaborado: Katherine Guzmán

#### **4.5 Electroforesis del gen 23S RNAr**

Las 7 cepas analizadas, se amplificaron para el fragmento 425pb 23S RNAr, todas las muestras sensibles, intermedio y resistente a nivel fenotípico a la CLA amplificaron debido a que todas las cepas de *H. pylori* presentan el 23S RNAr ya sea en su forma silvestre o con mutación, el cual se identifica mediante la secuenciación.



**Gráfico 2 Corrida electroforética de PCR para detectar la presencia del 23S RNAr**

En el pocillo 1 se colocó marcador de peso molecular 100pb, pocillo 2 control negativo, pocillo 3 control positivo (PHPE014), en los pocillos 4 al 10 se colocaron respectivamente las siguientes muestras PHPM 14, PHPE 80, PHPE 22, PHPM 34, PHPM 28, PHPE 25, PHPE 18 las cuales amplificaron para el gen 23S RNAr.

Elaborado: Katherine Guzmán

#### **4.6 Presencia de mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr**

Se analizaron 7 cepas, al realizar el análisis completo de las secuencias se encontró que una muestra resistentes y una intermedia presentan mutaciones A2144G, mientras que otras resistentes presentaron las mutaciones T2183C, G2221A, por último también se encontró que otras cepas resistentes no presentaron ninguna mutación. Las cepas que presentaron las mutaciones tiene una MIC variable de 0,38 hasta 256 µg/ml

**Tabla 6 Mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr, resistencia a la claritromicina.**

**MUTACION GEN 23S RNAR**

<b>MUESTRA</b>	<b>MIC (µg/ml)</b> <b>CLA</b>	<b>POSICION</b>	<b>BASE</b> <b>NITROGENADA</b>
PHPM 14	0,094 (S)	-	-
PHPE 80	0,38 (I)	2144	A→G
PHPE 22	8 (R)	2144	A→G
PHPM 28	24 (R)	2183	T→C
PHPM 34	0,5 (R)	2221	G→A
PHPE 18	3 (R)	-	-
PHPE 25	24 (R)	-	-

Presencia de mutaciones, cambio de base nitrogenada en cuatros cepas que según los puntos de corte del EUCAST, 2016 son intermedio y resistentes

Elaborado: Katherine Guzmán

## DISCUSIÓN

La infección de *H. pylori* tiene una prevalencia mayor del 80% a nivel mundial, con mayor afección en los países en vías de desarrollo. Este microorganismo produce diversas enfermedades gastrointestinales como gastritis crónica, úlceras péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico; los individuos inicialmente pueden ser asintomáticos, pero cuando aparecen los síntomas es necesario el diagnóstico temprano para prevenir que incremente la patología y efectuar el tratamiento de erradicación, sin embargo en los últimos años el diagnóstico y eliminación han constituido un importante problema de salud.

Por tanto, los métodos diagnósticos empleados para el análisis de *H. pylori* han variado clasificándolos por su detección de manera directa e indirecta como invasivos y no invasivos, cada uno de ellos con una sensibilidad y especificidad variada (Ritcey et al., 2014)(Blancas, 2004). En la práctica clínica, el análisis histopatológico es el más frecuente realizado en el país, en este estudio se encontró la presencia 69% de biopsias gástricas con infección por *H. pylori*, en cambio mediante el cultivo que es considerado también como el estándar de oro por su alta especificidad aunque con sensibilidad variable (70%-90%), se obtuvo en este trabajo el 42,4% de la presencia de la bacteria, en contraste con un estudio realizado en el 2003 en Guayaquil que obtuvieron un 71,4% de cultivo positivo (Debets-ossenkopp et al., 2003), no obstante el aislamiento bacteriano presenta una tasa de recuperación entre el 30% y 70% (Henao et al., 2009) (Arismendi-morillo et al., 2011) demostrando que la recuperación obtenida en este estudio fue moderada en su procesamiento, coincide con otros estudios en Colombia donde se encontró que la recuperación de *Helicobacter pylori* a partir de las biopsias gástricas presentan un rango desde 43% hasta 82% (Figuerola, Cortés, Pazos, & Bravo, 2012) (Trespalcios et al., 2010) (Yepes et al., 2008) (Bustamante-rengifo et al., 2013), la variabilidad en el aislamiento del microorganismo se le atribuye a varios factores desde la recolección de la muestra clínica, su localización y calidad, el transporte debido a que la bacteria es un organismo lábil al oxígeno, condiciones atmosféricas y la desecación, las condiciones de incubación, los medios de cultivo, además de que las muestras pueden tener un sobrecrecimiento por agentes exógenos o agentes endógenos (Mégraud & Lehours, 2007) (JP Gisbert, 2000) por otra parte la estructura cocoide de *H. pylori* que se da en condiciones desfavorables como aerobiosis, temperaturas altas, incubación extendida en agua u otras soluciones tanto *in vivo* como *in vitro* lo que dificulta el cultivo, y por ello existen números fracasos al realizar ensayos con las técnicas de cultivo (Cava & Cobas, 2003) (Sarem & Corti, 2016).

Hay que mencionar, además que el cultivo es costoso, se necesitan varias muestras (>4) provenientes de antro y cuerpo, no está disponible en los laboratorios de rutina debido a que es un método tedioso y difícil de realizar ya que *H. pylori* es un microorganismo fastidioso y de lento crecimiento (7-14 días) (Khalifehgholi et al., 2013) (Majalca-Martínez et al., 2001).

En este estudio la finalidad del cultivo era detectar la susceptibilidad antibiótica frente a la claritromicina, debido a que es frecuentemente aplicado en la terapia triple estándar, dando una eficacia mayor al 90%, sin embargo según el Consenso de Maastricht IV si existe resistencia a la claritromicina la tasa de éxito en la terapia se encuentra entre el 10%-30%, también informa que después del primer fracaso terapéutico con uso de la claritromicina se debería considerar que en cada región del país antes de dar el segundo tratamiento realizar las pruebas de susceptibilidad, con la probabilidad que se produzca alta resistencia al antibiótico (60-70%) (Malfertheiner et al., 2012).

El método recomendado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) es la dilución en agar pero por su compleja metodología y el alto costo, se optan por otras metodologías como la prueba epsilon (E-test) varios estudios demuestran que tiene sensibilidad y especificidad mayor al 95% (Arévalo et al., 2008); por tanto el método aplicado en este estudio es la tirilla por gradiente (E-test) de claritromicina con un MIC (0,016 – 256 µg/ml), indicando que la resistencia presente en este estudio es del 67,4%, que contrasta con la publicación realizada por la misma técnica en el Hospital de Solca de Guayaquil en el año 2003 que reportó resistencia a la claritromicina del 9,5% (4 cepas resistentes). El resultado obtenido demuestra que ha aumentado en comparación con estudios reportados en América Latina que indica que el nivel de prevalencia de resistencia a la claritromicina se encuentran en un rango de 2% al 63,1% que ha ido incrementando en la última década (Martínez et al., 2014). Sin embargo se mantiene dentro del margen establecido de probabilidad de resistencia por el Consenso de Maastricht IV, también es necesario señalar la importancia de hacer el seguimiento localmente a la frecuencia de la resistencia, ya que existen variaciones geográficas en la prevalencia de la resistencia a la claritromicina dentro de un mismo país (Henao et al., 2009).

Efecto que se observa al comparar este estudio con el del 2003, algo semejante ocurre en otros países como Colombia en el que se han realizado estudios en diferentes zonas del país acerca de la resistencia a la claritromicina, es así en ciudades de Pereira y Armenia (2009) es el 2.2%, Bogotá en 2008, 2009, 2010 indicaron 60%, 15% y 17.72% respectivamente, Tumaco

(2012) es del 19,8% de resistencia a la claritromicina; en cambio en Brasil en 2009, 2011 y 2014 presenta el 8%, 20,8% y 11,1% de resistencia a la claritromicina correspondientemente; Paraguay (2007) es del 2%; Chile en 2001 y 2011 se evidenció una resistencia del 2,2% y 9,1%; en otros países como España (2006), Taiwán (2014) los porcentajes de resistencia son 21,4% y 11,6%. El resultado de la elevada resistencia a la claritromicina se puede asociar al consumo previo de macrólidos para tratar enfermedades respiratorias y de piel.

La resistencia a la claritromicina en *Helicobacter pylori* se le asocia a modificaciones postranscripcionales o mutaciones puntuales situadas en el dominio V peptidiltransferasa del 23S RNAr, estas mutaciones están asociadas con la pérdida de unión del macrólido al ribosoma (Tanih & Ndip, 2013) (Klesiewicz et al., 2014), otros mecanismos realizados en menor proporción son impermeabilidad de la membrana o la formación de bombas e-flujo (Yonezawa et al., 2013) (Occhialini et al., 1997) (Nishizawa & Suzuki, 2014). La presencia de mutaciones puntuales en el 23S RNAr es considerado como el principal mecanismo de resistencia a la claritromicina, debido a que se inhibe su unión con la subunidad ribosomal (Wu et al., 2014) (Nishizawa & Suzuki, 2014). Estas mutaciones incluyen la transición, de una adenina a guanina en la posición 2143, 2142 y transversión en 2142 de adenina a citosina (Nishizawa & Suzuki, 2014).

Los estudios han demostrado que la mutación A2143G es la más estable y prevalente que se ha reportado en las cepas resistentes a la claritromicina a nivel fenotípico, seguida de A2142G y A2142C. (Wu et al., 2014). Los métodos genotípicos más usados para detección de estas mutaciones son PCR-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o *Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR en tiempo real (Klesiewicz et al., 2014), otros estudios también aplican la PCR seguida de secuenciación, PCR por hibridación (Acosta et al., 2013). A nivel de América Latina como de países europeos y del continente asiático reportan que la mutación A2143G está presente en más del 70% de las cepas resistentes, en proporción media A2142G Y A2142C (>10%, >2%)(Wu et al., 2014) (Lins, Lima, & Magalh, 2010) (Acosta et al., 2013). Sin embargo se han presentado en menor proporción otro tipo de mutaciones como en diferentes partes del mundo como T2243C (Irán), C2245T, G2244A, T2289C, T21822C (Asia)(Mégraud & Lehours, 2007), A2146G, A2147G, A2115G, T2289C, G2141A (South África, Taiwán) (Tanih & Ndip, 2013) (Wu et al., 2014).

El estudio demostró que las cepas resistentes de *Helicobacter pylori* tiene gran variabilidad en la MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ), por tanto se seleccionaron algunas cepas para realizar su análisis genotípico mediante la PCR convencional seguido de la secuenciación. Los resultados obtenidos indican que la cepa sensible no presentó ningún tipo de mutación junto con unas cepas resistentes, en las cuales se consideran que presentó otro tipo de mecanismo de resistencia probablemente la presencia de bombas e-flujo (Kim, Kang, Eun, Han, & Choi, 2002); en cambio las cepas restantes con MIC Resistente se identificaron tres tipos de mutaciones A2144G, G2221A, T2183C, también se observa una mutación en una cepa con MIC intermedio. La primera mutación encontrada en este estudio reveló una mutación de A a G en la posición 2144, la misma que coincide con estudios realizados en Asia donde esta mutación es la más frecuente como en Japón (90%), Tailandia (40,5%), Corea(57,1%), Turquía (29,7%) la cual contribuyen con la resistencia a la claritromicina, presentándose con MIC variables de 8 a 256  $\mu\text{g/mL}$ , en cambio en este estudio la MIC en la que presentó esta mutación se encuentre de 0,38 a 8  $\mu\text{g/mL}$  (Zaidi et al., 2009) (Sezgin et al., 2008) (Agudo et al., 2009), contribuyendo a que esta mutación también puede estar presente en concentraciones bajas de claritromicina detectadas a nivel fenotípico. Sin embargo, la mutación de T a C en la posición 2183 presente en Corea (7,1%) con una MIC baja de 2  $\mu\text{g/mL}$ , contrasta con el encontrado en este estudio debido que la MIC es alta. (Yoon, Park, Lee, Kim, & Kim, 2014).

Por último, este estudio reveló la presencia de una nueva mutación G2221A el cual puede estar presente en MIC bajas y su asociación a la resistencia al antibiótico no es clara, debido que no existen reportes previos de esta mutación.

Por lo tanto, el estudio indica que el porcentaje de resistencia a la claritromicina ha aumentado en relación con los trabajos realizados a nivel de América Latina, y mostrando que si existe variabilidad en las diversas zonas geográficas, que incluso podría corresponder a la presencia de diferentes mutaciones puntuales en relación a las más estudiadas (A2143G, A2142G), permitiendo evaluar que el tratamiento aplicado en nuestro país no debería ser de manera empírica, dado que se debería conocer si el paciente tuvo algún consumo previo de macrólidos ya que puede ser un indicio para presentar cepas resistentes a la claritromicina en la actualidad.



## CONCLUSIONES

1. La presencia de infección por *H. pylori* mediante cultivo fue de 42,4%, en relación al histopatológico que es del 69%. Encontrándose en este estudio que la concordancia entre ambos métodos para la detección de *H. pylori* es aceptable ( $k=0,449$ ), se alude que es debido a la dificultad y tiempo en el transporte y manipulación de las muestras clínicas hasta el laboratorio de microbiología donde se realizó su procesamiento para el cultivo.
2. Se observó que las lesiones causadas en el tejido gástrico por la presencia de *H. pylori* indica que la más frecuente es la gastritis crónica no atrófica, de esta se recuperó por medio del cultivo el 30% a diferencia de las otras lesiones que se recuperaron en su totalidad.
3. La resistencia a la claritromicina presente en las cepas aisladas provenientes de las biopsias gástricas es de 67,9%, con presencia de 3 cepas intermedias. La mayoría de cepas *in vitro* presentan un MIC > 256 µg/ml.
4. Con relación a las lesiones las cepas más resistentes se encontraron en la gastritis crónica folicular (19,2%) seguida de la gastritis crónica difusa, las demás lesiones presentaron porcentajes bajos de las cepas resistentes.
5. Las cepas analizadas a nivel genotípico, las resistentes presentaron tres mutaciones en la posición 2144 (A→G), 2183(T→C), 2221 (G→A), mientras que la cepa intermedia presentó la 2144 (A→G), las cuales no presentan una relación directa con la concentración mínima inhibitoria (MIC) indicando que las mutaciones pueden estar presentes desde el rango de resistencia más bajo hasta el más alto de MIC *in vitro*.
6. Los datos encontrados en los hospitales de estudio indica que la resistencia a la claritromicina ha aumentado, indicando que el porcentaje de resistencia es mayor al establecido a nivel de América Latina. Sin embargo se encuentra dentro del rango de 60% - 70% según la guía del Consenso de Maastricht IV, se puede considerar que los pacientes que participaron en el estudio ya recibieron un tratamiento previo o consumieron macrólidos para tratar otro tipo de infecciones (respiratorias, piel), por tanto la utilización de este antibiótico de manera empírica no es aconsejable ya que la eficiencia del tratamiento disminuye y decrece la capacidad del medicamento para la erradicación de *H. pylori*

## RECOMENDACIONES

Se sugiere ampliar el estudio de la resistencia a la claritromicina, debido a que los valores de susceptibilidad pueden variar en las diferentes zonas geográficas o regiones del mismo país, como se observa en estudios realizados en América Latina, razón por lo que podría estar fallando el tratamiento de erradicación.

Es recomendable que los médicos antes de dar un segundo tratamiento de erradicación, si el primero ha fallado consideren la prevalencia de la región ante el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, y como lo especifica el Consenso de Maastricht IV se realice el cultivo o pruebas moleculares para detectar la resistencia a la claritromicina.

El método molecular más recomendado es la PCR-RFLP, sin embargo, a través de este estudio se propone usar PCR convencional con la secuenciación debido a que en los últimos años las mutaciones puntuales en el 23S RNAr han aumentado y cambiado, es necesario conocer cuáles son las más prevalentes en el país.

Se sugiere que el estudio de las mutaciones puntuales se realice en todas las cepas resistentes para encontrar que tipos de mutaciones están presentes y correlacionarlo con la resistencia fenotípica, además se recomienda el uso de primers/cebadores que identifique las dos copias de 23S RNAr presente en *H. pylori*, para identificar si existe heterogeneidad o presencia de un gen mutante y un gen salvaje del 23S RNAr, para relacionarlo con el fenotipo de resistencia a la claritromicina.

Se recomienda la realización de un sistema de control y educación del uso de antibióticos, o seguimiento del consumo previo de macrólidos, debido a que el bajo control en su consumo es considerado una de las razones para el incremento de la resistencia antibiótica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, H., Savari, M., Zahedi, M. J., Moghadam, S. D., & Abasi, M. H. (2011). Detection of A2142C, A2142G, and A2143G mutations in 23s rRNA gene conferring resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates in Kerman, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 36(2), 104–110.
- Acosta, C. P., Hurtado, F. A., & Trespalacios, A. A. (2013). Determinación de mutaciones de un solo nucleótido en el gen 23S rRNA de *Helicobacter pylori* relacionadas con resistencia a claritromicina en una población del departamento del Cauca, Colombia. *Revista Medica de Chile*, 34(1), 156–162. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.006>
- Agudo, S., Alarcón, T., Cibrelus, L., Urruzuno, P., Martínez, M. J., & López-Brea, M. (2009). High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 22(2), 88–92.
- Alonso, M., Ruiz, O., & Riveros, J. (2014). Utilidad de la endoscopia digestiva alta diagnóstica en pacientes menores de 18 años. *Rev Col Gastroenterología*, 29(2).
- Álvarez, A., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Santacoloma, M., Corredor, L. F., & Reinos, E. (2009). Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 4022–4024. <http://doi.org/10.1128/AAC.00145-09>
- Alzahrani, S. (2014). Effect of on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 12767. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12767>
- Amieva, M. R., & El-Omar, E. M. (2008). Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306–323. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.009>
- Arévalo, M. R., Ávila, J., Trespalacios, A., Villamizar, O., Otero, W., & Mercado, M. (2008). Sensibilidad y especificidad de E-test para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. *Biomédica. Revista Del*

- Instituto Nacional de Salud, Colombia*, 6(10), 219–229. <http://doi.org/ISSN: 1794-2470>
- Arismendi-morillo, G., Hernández, I., Mengual, E., Fuenmayor, A., Romero, G., & Lizarzábal, M. (2011). Comparison of three methods based on endoscopic gastric biopsies for diagnosis of *Helicobacter pylori* active infection in a clinical setting. *Archivos de Gastroenterología*, 48(3), 190–194. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032011000300007>
- Ávila, J., Rey, M., Mercado, M., Villamizar, O., Otero, W., & Trespalacios, A. A. (2009). Comparación de las pruebas de dilución en Agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*.
- Barragan, C., Gutierrez, A., & Castiblanco, L. (2015). Membrana externa de *Helicobacter pylori* y su papel en la adhesión al epitelio gástrico. *Universidad Médica de Colombia*, 56(1), 44–62. <http://doi.org/ISSN 0041-9095>
- Barahona, A., & Piñero, D. (1994). *Genetica: La continuidad de la vida*. Mexico: Fondo de cultura económica. doi:ISBN 978-607-16-1635-7
- Bayona, M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 28(2), 94 – 99. <http://doi.org/ISSN 0120-9957>
- Beilenhoff, U., Neumann, C., Rey, J., & Bieri, H. (2008). ESGE–ESGENA guideline: Cleaning and disinfection in gastrointestinal endoscopy. *World Gastroenterology Organization*, 40(11), 939-957. doi:DOI: 10.1055/s-2008-1077722
- Bermúdez, L., Torres, L., & Rodríguez, B. (2008). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Centro Nacional de Investigación Científica. Cuba*, 48(1), 1-12. Obtenido de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol48\\_1\\_09/med07109.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol48_1_09/med07109.htm)
- Beswick, E. J., Suarez, G., Reyes, V. E., Beswick, E. J., Suarez, G., & Reyes, V. E. (2006). H pylori and host interactions that influence pathogenesis H PYLORI INFECTION AND DISEASES, 12(35), 5599–5605.
- Blancas, J. M. (2004). La importancia del diagnóstico del *Helicobacter pylori*. *Revista Gastroenterológica de México*, 69(3), 186–187.

- Boto, L. (2010). Uso de técnicas de Biología Molecular en las Ciencias Naturales. *Dpto. Biodiversidad y Biología Evolutiva. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)*, 1-5.
- Bustamante-rengifo, J. A., Matta, A. J., Pazos, A., Bravo, L. E., Bustamante-rengifo, J. A., & Matta, A. J. (2013). In vitro effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates. *World Journal of Gastroenterology*, 19(36), 6044–6054. <http://doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6044>
- Burriel, V. (2008). *Estructura y propiedades de los Ácidos nucleicos*. Obtenido de [http://www.uv.es/tunon/pdf\\_doc/AcidosNucleicos\\_veronica.pdf](http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/AcidosNucleicos_veronica.pdf)
- Cabrera, C., Gomez, R., & Zuñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Revista Colombia Medica*, 38(2), 149-158.
- Camargo, M. C., García, A., Riquelme, A., Camargo, C. A., Hernandez-garcía, T., Candia, R., ... Rabkin, C. S. (2015). The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *The American Journal of Gastroenterology*, 2014(4), 485–495. <http://doi.org/10.1038/ajg.2014.24>.The
- Castro, M., & Vargas, J. (2009). Infection with *Helicobacter pylori*. Prevalence, research and impact of antibiotic resistance. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 101(11), 743-775. doi:ISSN 1130-0108
- Cava, F., & Cobas, G. (2003). Formas cocoides de *Helicobacter pylori*: viables o degenerativas. *Vaccimonitor*, 12(2), 7–12. <http://doi.org/ISSN 1025-0298>.
- Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. (2009). Macrolidos y cetolidos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clinica*, 27(07), 1-13.
- Cristina, A., Cadamuro, T., Flávia, A., Rossi, T., Maniezzo, N. M., Silva, A. E., ... Rossi, T. (2014). *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs, 20(6), 1424–1437. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1424>
- De Argila, C., & Boixeda, D. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedades relacionadas. *Elsevier.es*, 3(6), 251–255. Retrieved from [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pidet\\_articulo=70000216&pidet\\_](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=70000216&pidet_)

usuario=0&pcontactid=&pident\_revista=8&ty=169&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=v3n6a216pdf001.pdf

- Debets-ossenkopp, Y. J., Reyes, G., Mulder, J., Stegge, B. M. De, Peters, J. T. A. M., Savelkoul, P. H. M., ... Vandenbroucke-grauls, C. M. J. E. (2003). Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 141–145. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg023>
- Espino, A. (2010). Infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología Latinoamericana*, 21(2), 323–327. [http://doi.org/10.1016/S0014-2565\(02\)70995-8](http://doi.org/10.1016/S0014-2565(02)70995-8)
- EUCAST. (2016). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Obtenido de [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- Explorable.com. (13 de Julio de 2009). *Explorable.com*. Recuperado el 13 de Enero de 2016, de Explorable.com: <https://explorable.com/es/muestreo-aleatorio>
- Fábregas, C. (2002). Endoscopia Superior Diagnostica. Principios Básicos y Técnica. *Gastroenterología. Infomed Red de Salud de Cuba*, 1-5.
- Fariña, N., Kasamatsu, E., Samudio, M., Morán, M., Sanabria, R., & Laspina, F. (2007). Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastro-duodenal. *Revista Médica de Chile*, 135(8), 1009–1014. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872007000800008>
- Figuerola, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica. Revista Del Instituto Nacional de Salud, Colombia*, 32(1), 32–42. <http://doi.org/ISSN: 0120-4157>
- Gámez Escalona, M. M., Mulet Pérez, C. A. M., Miranda Moles, Z., & Mulet Gámez, A. M. (2007). Gastritis crónica antral por *Helicobacter pylori* en la infancia. *Revista Pediátrica de Cuba*, 80(1), 1–12. Retrieved from [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ped/vol80\\_1\\_08/ped02108.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ped/vol80_1_08/ped02108.htm)
- Gilger. (2005). Pediatric endoscopy: new information from the PEDS-CORI project. *Currente Gastroenterology Reports*, 7(3), 234-9.

- Gisbert, J. (2000). Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y Hepatología*, 23(3), 135–143. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-revision-critica-los-metodos-diagnosticos-9806>
- Gisbert, J. (2011). Tratamientos de rescate ante el fracaso erradicador de *Helicobacter pylori*. *Gastroenterologia Y Hepatologia*, 34(2), 89–99. <http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2010.10.013>
- Gisbert, J., Del Mar Cabrera, M., & Pajares, J. (2002). Detección del antígeno de *Helicobacter pylori* en heces para el diagnóstico inicial de la infección y para la confirmación de su erradicación tras el tratamiento. *Medicina Clínica*, 118(11), 401–404. [http://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)72402-0](http://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)72402-0)
- González C, C., García C, A., Daroch M, F., Kawaguchi P, F., Solar R, H., Rivera F, N., & Vega C, E. (2001). Susceptibilidad in vitro de cepas de *Helicobacter pylori*: aislamiento de cepas resistentes a claritromicina. *Revista Médica de Chile*, 129(6), 643–646. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872001000600007>
- González F, C. G., Serrano H, C., & Harris D, P. R. (2007). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. *Revista Medica de Chile*, 135(2), 182–188. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872007000200006>
- González, L., & Rodríguez, B. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas*, 50(4), 1 - 10. doi:[http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol50\\_4\\_11/med10411.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol50_4_11/med10411.htm)
- González, P., Dávalos, V., Chávez, A., & Reyes, M. (2012). Manual Práctico de Sedación y Analgesia en Procedimientos Endoscópicos. *Hospital docente UTPL*, 2-187. doi:ISBN: 978-9942-08-396-8
- Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas . (06 de 07 de 2011). *MACROGEN* . Recuperado el 01 de 11 de 2015, de Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas : [http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq\\_submission.jsp](http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq_submission.jsp)
- Hagymási, K., & Tulassay, Z. (2014). *Helicobacter pylori* infection : New pathogenetic and

- clinical aspects, 20(21), 6386–6399. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6386>
- Harris, P., Godoy, A., & Guiraldes, E. (2001). Dolor abdominal, dispepsia y gastritis en pediatría: Rol del *Helicobacter pylori*. *Revista Chilena de Pediatría*, 72(2), 81–91. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062001000200002>
- Henao, S. C., Quiroga, A., Martínez, J., & Otero, W. (2009). Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24(2), 110–114. <http://doi.org/ISSN: 0120-9957>
- Horna, G., & Silva, M. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-45. doi:ISSN 1729-214X
- Hunt, R. H. (2010). *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. *Guías Prácticas de La WGO*, 3–5. Retrieved from [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/helicobacter\\_pylori\\_en\\_los\\_paises\\_desarrollo.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/helicobacter_pylori_en_los_paises_desarrollo.pdf)
- Jaramillo, S. (1998). Prueba Épsilon (E-test). *Revista CES MEDICINA*, 12(1), 34 -41.
- Khalifehgholi, M., Shamsipour, F., Ajhdarkosh, H., Daryani, N. E., Reza Pourmand, M., Hosseini, M., ... Hasan Shirazi, M. (2013). Comparison of five diagnostic methods for *Helicobacter pylori*. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(4), 396–401.
- Kim, K. S., Kang, J. O., Eun, C. S., Han, D. S., & Choi, T. Y. (2002). Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 17(5), 599–603. <http://doi.org/200210599> [pii]
- Kimberly-Clark. (2006). *Prueba rápida de ureasa CLOtest*. Obtenido de <http://www.transmedica.com.mx/wp-content/uploads/2016/05/Catalogo-Clotest.pdf>
- Klesiewicz, K., Nowak, P., Karczewska, E., Skiba, I., Wojtas-Bonior, I., Sito, E., & Budak, A. (2014). PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains. *Acta Biochimica Polonica*, 61(2), 311–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927236>



- Kodaira, M. S., Escobar, A. M. D. U., & Grisi, S. (2002). Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Revista Saúde Pública*, 36(3), 356–369. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102002000300017>
- Lins, A. K., Lima, R. A., & Magalh, M. (2010). CLARITHROMYCIN-RESISTANT *Helicobacter pylori* IN RECIFE, BRAZIL, DIRECTLY IDENTIFIED FROM GASTRIC BIOPSIES BY POLYMERASE CHAIN REACTION. *Arq Gastroenterology*, 47(4), 379–382.
- Majalca-Martínez, C., Rivera, J., Ocho-Perez, S., & Giono, S. (2001). Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*, 26(4), 85–89. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611574003>
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C. A. C. a., Atherton, J., Axon, A. T. R., Bazzoli, F., ... The European Helicobacter Study Group. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61(5), 646–664. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
- Martín, C., Argila, D., & Boixeda, D. (2001). Consideraciones prácticas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Medicina Clínica*, 117(10), 386–391.
- Martínez, J. D., Henao, S. C., & Lizarazo, J. I. (2014). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. *Rev. Colomb. Gastroenterol*, 29(3), 218–227.
- Mégraud, F., & Corti, R. (2009). Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 39(4), 282–290. <http://doi.org/ISSN: 0300-9033>
- Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 280–322. <http://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Mikkonen, T. P., Kärenlampi, R. I., & Hänninen, M. L. (2004). Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 753–758. <http://doi.org/10.1099/ij.s.0.02839-0>

- Molano, J., Piñeros, S., & López, C. (2008). Dispepsia y reflujo gastroesofágico en adolescentes escolarizados. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 23(1), 56. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v23n1/v23n1a06.pdf>
- Moncayo, J., Álvarez, A., Santacruz, J., Arturo, B., Giraldo, L., & Pinzón, A. (2011). Evaluación de diferentes pruebas para el diagnóstico de *H. pylori*. *Investigaciones Andina*, 13(23), 297–311. <http://doi.org/ISSN: 0124-8146>
- Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., Álvarez, A. L., Franco, B., López, M. A., Ángel, A., ... Serrano, H. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Medica*, 37(3), 203–212.
- Moreira, V. F., & Lopez, A. (2004). Úlcera Péptica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96(1), 81–82. <http://doi.org/10.4321/S1130-01082004000100011>
- Morris Brown, L. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283–297. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040>
- Muller-Esterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para la medicina y ciencias de la vida*. Barcelona: Editorial Reverté. doi:ISBN: 978-84-291-7393-2
- Naranjo, D., Suárez, M., Bayona, M., Gallego, M., Urbina, M., & Rojas, D. (2012). Aspectos Históricos , Epidemiológicos En Humanos Y En Caninos. *Revista de Medicina de Bogotá*, 34(2), 146–161.
- Nicole, P., Amador, A., Delgado, P., Camila, M., Ortiz, M., Magdalena, M., ... Henao, C. J. (2009). Caracterización molecular y bioinformática de la proteína CagA de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes colombianos protein using gastric biopsies of Colombian patients, (3), 353–362.
- Nishizawa, T., & Suzuki, H. (2014). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1(19), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>
- Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., B??b??ar, C. M., Lamouliatte, H., & Mégraud, F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: Rapid detection of point

- mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), 2724–2728.
- Olivares, D., & Gisbert, J. P. (2006). Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(19), 374–381. <http://doi.org/ISSN 1130-0108>
- OMS. (abril de 2015). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- ONSALUS. (2015). *ONSALUS. DICCIONARIO MEDICO*. Obtenido de <http://www.onsalus.com/diccionario/microaerofilo/17986#sthash.Wj18Fv7E.dpuf>
- Otero Regino, W., Trespalacios, A. A., & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori* : Tratamiento actual Un importante reto en gastroenterología. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24(3), 279–292. <http://doi.org/ISSN 0120-9957>
- Pajares García, J. M., Pajares-Villarroya, R., & Gisbert, J. P. (2007). *Helicobacter pylori*: Resistencia a los antibióticos. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 99(2), 63–70. <http://doi.org/10.4321/S1130-01082007000200001>
- Pajares, J. M., & Gisbert, J. P. (2006). *Helicobacter pylori* : su descubrimiento e importancia en la medicina. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 98(10), 778–785. <http://doi.org/ISSN 1130-0108>
- Palomino, C., & Tomé Boschian, E. (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 25(2), 85–93. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=90334188&lang=es&site=ehost-live>
- Páramo, D. B., Rodríguez, I. A., & Toledo, J. D. (2014). Eficacia de la erradicación del *Helicobacter pylori* en la prevención del cáncer gástrico: Revisión sistemática y metanálisis. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 29(3), 262 – 269. <http://doi.org/ISSN 0120-9957>
- Parra, T., & Carballo, F. (1998). Reservorios y vías de transmisión de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales Sis San Navarra*, 21(2), 19–26. Retrieved from

[https://www.researchgate.net/publication/238089095\\_Reservorios\\_y\\_vias\\_de\\_transmision\\_de\\_la\\_infeccion\\_por\\_Helicobacter\\_pylori\\_Reservoirs\\_and\\_means\\_of\\_transmission\\_of\\_the\\_infection\\_by\\_Helicobacter\\_pylori](https://www.researchgate.net/publication/238089095_Reservorios_y_vias_de_transmision_de_la_infeccion_por_Helicobacter_pylori_Reservoirs_and_means_of_transmission_of_the_infection_by_Helicobacter_pylori)

- Patel, S. K., Pratap, C. B., Jain, A. K., Gulati, A. K., & Nath, G. (2014). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 12847–12859. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12847>
- Picoli, S., Mazzoleni, L., Fernández, H., De Bona, R., Neuhauss, E., Longo, L., & Prolla, C. (2014). RESISTANCE TO AMOXICILLIN, CLARITHROMYCIN AND CIPROFLOXACIN OF *Helicobacter pylori* ISOLATED FROM SOUTHERN BRAZIL PATIENTS. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(3), 197–200. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652014000300003>
- Premoli, G., González, A., Millán-Mendoza, B., Percoco, T., & Vielma, A. (2004). Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop*, 56(2), 6.
- Promega. (2014). *Wizard Genomic DNA Purification Kit TM050*. Obtenido de <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>
- Promega Corporation, S. (15 de 07 de 2014). *Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin TB308*. Recuperado el 01 de 08 de 2015, de <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20clean-up%20system%20protocol.pdf>
- Ramírez Ramos, A., & Sánchez Sánchez, R. (2008). *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 -2008): Patogenia , Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 29(2), 158–170. Retrieved from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol29n2/pdf/a08v29n2.pdf>
- Ramirez, N., & Quintanilla, P. (2007). Infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría*, 45(2), 5–13. <http://doi.org/ISSN 1024-0675>
- Ramos, A. R., & Sánchez, R. S. (2008). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Rev.*

- Gastroenterol. Perú*, 28(5), 258–266. [http://doi.org/cancer gastrico](http://doi.org/cancer_gastrico)
- Regino, W. O. (2013). La importancia de cultivar *Helicobacter pylori* The growing importance of *Helicobacter pylori*, (13), 87–92.
- Ritcey, D., Estrada, R., Esther, D., Sosa, N., Lídice, D., Montalvo, A., ... Carrillo, V. (2014). REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA *HELICOBACTER PYLORI* COMO AGENTE CAUSAL DE AFEC- CIONES GASTROINTESTINALES *HELICOBACTER PYLORI* AS A CAUSAL AGENT OF GA- STROINTESTINAL AFFECTIONS. *Revista Cubana de Tecnología de Salud*, 1–8. <http://doi.org/ISSN: 2218-6719>
- Rivera, M., Contreras, F., Terán, A., & Fouillioux, C. (2004). *Helicobacter pylori*: Enteropatógeno frecuente del ser humano. *Archivos Venezolanos de Farmacología Y Terapéutica*, 23(2), 1–14. <http://doi.org/ISSN 0798-02640798-0264>
- Romo González, C., & Coria Jiménez, V. R. (2010). *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 15(4), 242–251. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/473/47316086010.pdf>
- Ruiz Alvarez, V., Marin Julia, S. M., & Hernandez Triana, M. (2005). *Helicobacter pylori* y diarrea en niños. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, vol 43(2), 58. <http://doi.org/ISSN: 0253-1751>
- Sánchez, F., Taxonera, C., García, M., Alba López, C., Sainz de los Terreros, L., & Díaz-Rubio, M. (2007). Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en población sana en la Comunidad de Madrid. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(9), 497–501. <http://doi.org/ISSN 1130-0108>
- Sánchez, J., Canizalez, V., León, N., Irineo, A., & Bernal, G. (2015). Concordancia entre procedimientos diagnósticos invasivos para la infecci??n por *Helicobacter pylori* en adultos. *Salud Publica de Mexico*, 57(4), 352–357.
- Sánchez, J., Ramirez, É., Mendoza, A., Zárate, A., López, T., & Marquez, H. (1999). Diagnóstico y tratamiento oportunos de la infección por *Helicobacter pylori* ; solución a un problema de salud \*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 46(1), 4 –13.

- Sarem, M., & Corti, R. (2016). Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. *Gastroenterología Y Hepatología*, 39(5), 1–13. <http://doi.org/doi: 10.1016/j.gastrohep.2015.04.009>
- Serim. (2012). *PyloriTek*. Obtenido de [http://www.serim.com/products\\_overview.aspx?fid=2](http://www.serim.com/products_overview.aspx?fid=2)
- Serrano, A., Candelaria-Hernández, M., De la Garza, J., & Herrera, L. (2009). *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología*, 4(4), 193–204. <http://doi.org/10.1007/s00108-009-2438-3>
- Sezgin, O., Aslan, G., Altıntaş, E., Tezcan, S., Serin, M. S., & Emekdaş, G. (2008). Detection of point mutations on 23S rRNA of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin with PCR-RFLP in gastric biopsy specimens in Mersin, Turkey. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 19(3), 163–167.
- Solnick, J. a Y. V., & Schauer, D. B. (2001). Emergence of Diverse *Helicobacter* Species in the Pathogenesis of Gastric and Enterohepatic Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 59–97. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.1.59>
- Stewart Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Collins, D., Sly, L., McConnell, W., & Harper, W. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen.nov.as *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 397–405. <http://doi.org/10.1099/00207713-39-4-397>
- Suárez, J. L., Reyes, G., & Herreros, L. del M. (2011). *Helicobacter pylori*: revisión de los aspectos fisiológicos y patológicos. *Revista de Los Estudiantes de Medicina de La Universidad Industrial de Santander*, 24(3), 287 – 296. Retrieved from <http://www.medicasuis.org/antiores/volumen24.3/doc3.pdf>
- Tanih, N. F., & Ndip, R. N. (2013). Molecular detection of antibiotic resistance in South African isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Research and Practice*, 20(13), 1–6. <http://doi.org/10.1155/2013/259457>
- Torres, L., & Rodríguez, B. (2008). Principales factores de patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 52–62. Retrieved from

<http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/files/CB-2008-1-052-062.pdf>

- Trespalcios, A. A., Regino, W. O., & Reyes, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25(1), 31–38. <http://doi.org/ISSN: 0120-9957>
- UCV. (2010). *Génética Molecular*. Obtenido de [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema\\_7\\_Gen%C3%A9tica.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_7_Gen%C3%A9tica.pdf)
- Uehara, G., Nago, A., Espinoza, R., Vargas, G., Astete, M., Morán, L., & Nuñez, N. (2007). Edad óptima para el despistaje endoscópico de cáncer gástrico en pacientes con dispepsia sin síntomas de alarma. *Revista Gastroenterológica Del Perú*, 27, 339–348. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292007000400002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292007000400002&script=sci_arttext)
- Vallejos M, C., Garrido O, L., Cáceres L, D., Madrid, A. M., Defilippi, C., Defilippi C, C., & Toledo A, H. (2007). Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la región metropolitana. *Revista Medica de Chile*, 135(3), 287–293. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872007000300002>
- Vallejos, C., Cerda, O., Valenzuela, M., & Toledo, H. (2003). Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: Aspectos clínicos y moleculares. *Revista Medica de Chile*, 131(11), 1313–1320. <http://doi.org/10.4067/S0034-98872003001100014>
- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M. V, Beyer, J., Tanaka, S. K., ... Go, M. a E. F. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* . Mutations in 23S rRNA Are Associated with Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori*, 40(2), 477–480.
- Washington, D. (1998). Diferencias epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en países desarrollados y en desarrollo. *Revista PanamWashington, D. (1998). Diferencias Epidemiológicas de La Infección Por Helicobacter pylori En Países Desarrollados Y En Desarrollo. Revista Panamericana de Salud Pública*, 3(2), 117–120. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49891998,> 3(2), 117–120. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49891998000200009>

- White, J. R., Winter, J. A., & Robinson, K. (2015). Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection : etiology and clinical outcomes, 137–147.
- Wu, J. Y., Wang, S. S. W., Lee, Y. C., Yamaoka, Y., Graham, D. Y., Jan, C. M., ... Wu, D. C. (2014). Detection of genotypic clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by string tests. *World Journal of Gastroenterology*, 20(12), 3343–3349. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3343>
- Yahaghi, E., Khamesipour, F., Mashayekhi, F., Dehkordi, F. S., Sakhaei, M. H., Masoudimanesh, M., & Khameneie, M. K. (2014). *Helicobacter pylori* in vegetables and salads: Genotyping and antimicrobial resistance properties. *BioMed Research International*, 20(14), 1–11. <http://doi.org/10.1155/2014/757941>
- Yepes, C., Rodríguez, A., Ruiz, Á., & Ariza, B. (2008). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* at the San Ignacio University Hospital in Bogota. *Acta Medica Colombiana*, 33(1), 11–14. <http://doi.org/ISSN: 0120-2448>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Ochiai, K., & Kamiya, S. (2013). Impact of *Helicobacter pylori* Biofilm Formation on Clarithromycin Susceptibility and Generation of Resistance Mutations. *PLoS ONE*, 8(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073301>
- Yoon, K. H., Park, S. W., Lee, S. W., Kim, B. J., & Kim, J. G. (2014). Clarithromycin-based standard triple therapy can still be effective for *Helicobacter pylori* eradication in some parts of the Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 29(9), 1240–1246. <http://doi.org/10.3346/jkms.2014.29.9.1240>
- Zaidi, S. F. H., Yoshida, I., Butt, F., Yusuf, M. A., Usmanghani, K., Kadowaki, M., & Sugiyama, T. (2009). Potent bactericidal constituents from *Mallotus philippinensis* against clarithromycin and metronidazole resistant strains of Japanese and Pakistani *Helicobacter pylori*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(4), 631–6. <http://doi.org/10.1248/bpb.32.631>



## ANEXOS

### ANEXO I Componente antimicrobiano del *Helicobacter pylori* Selective Supplement (Dent)

#### OXOID QUALITY ASSURANCE

#### PRODUCT SPECIFICATION

#### HELICOBACTER PYLORI SELECTIVE SUPPLEMENT (DENT) (OXOID) SR0147E

##### Formula

Per vial (each vial is sufficient to supplement 500ml of medium)

Vancomycin	5.0 mg
Trimethoprim	2.5 mg
Cefsulodin	2.5 mg
Amphotericin B	2.5 mg

##### Description

A selective supplement for the isolation of *Helicobacter pylori* from clinical specimens.

##### Directions

To one vial aseptically add 2ml of sterile distilled water and mix gently to dissolve the contents completely. Avoid frothing. Add the contents of 1 vial aseptically to 500ml of sterile Columbia Blood Agar Base (CM0331), cooled to 50°C and add 35ml laked horse blood (SR0048). Mix well and pour into sterile Petri dishes.

##### Physical Characteristics

Pale yellow pellet  
Sterility - passes test

##### Bacteriological Tests using Optimum Inoculum Dilution


Reactions after incubation at 37°C for 3-5 days under microaerophilic conditions  
(for details refer to Oxoid Manual - Atmosphere Generation Systems)

<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC® 43526	Pinpoint-0.5mm colourless colonies
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC® 43504	Pinpoint-0.5mm colourless colonies
<i>Proteus hauseri</i>	ATCC® 13315	1mm grey spreading colonies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853	1-2mm grey colonies
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231	No growth
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 19433	No growth
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	No growth

#### Figura 4 *Helicobacter pylori* Selective Supplement (DENT)

OXOID. (2008). *Helicobacter pylori* Selective Supplement (Dent). Obtenido de ThermoFisher Scientific:  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BT-SPEC-0496.pdf>

## ANEXO II Componentes del Kit de extracción y purificación de DNA



**2. Product Components and Storage Conditions**

**Small-Scale Isolation (minipreps)**

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	500 isolations	A1125

Each system contains sufficient reagents for 500 isolations of genomic DNA from 300µl of whole blood samples. Includes:

- 500ml Cell Lysis Solution
- 250ml Nuclei Lysis Solution
- 125ml Protein Precipitation Solution
- 100ml DNA Rehydration Solution
- 1.25ml RNase A Solution

**Large-Scale Isolation (maxiprep)**

**Items Available Separately**

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Cell Lysis Solution	1L	A7933
Nuclei Lysis Solution	1L	A7943
Protein Precipitation Solution	350ml	A7953
DNA Rehydration Solution	50ml	A7963
RNase A (4mg/ml)	1ml	A7973

**Storage Conditions:** Store the Wizard® Genomic DNA Purification Kit at room temperature (15–30°C). See product label for expiration date.

---

2 Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA • Toll Free In USA 800-356-9526 • 608-274-4330 • Fax 608-277-2516  
TM050 • Revised 12/14 www.promega.com

**Figura 5 Componentes y condiciones del Wizard Genomic DNA Purification Kit**

Fuente: Promega. (2014). *Wizard Genomic DNA Purification Kit TM050*. Obtenido de

<https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>



## 2. Product Components and Storage Conditions

PRODUCT	SIZE	CAT.#
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	250 preps	A9282

Each system contains sufficient reagents for 250 purifications. Includes:

- 100ml Membrane Binding Solution
- 75ml Membrane Wash Solution (concentrated)
- 13ml Nuclease-Free Water
- 250 Wizard® SV Minicolumns
- 250 Collection Tubes (2ml)

**Storage Conditions:** Store all components at room temperature (22–25°C). No refrigeration is required. Keep Membrane Binding Solution protected from light. See expiration date on product label.

-----  
Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA • Toll Free in USA 800-356-9526 • 608-274-4330 • Fax 608-277-2516  
www.promega.com TB308 • Revised 12/10

### Figura 6 Componentes y condiciones del Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

Fuente: Promega Corporation, S. (15 de 07 de 2014). *Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin*

TB308. Recuperado el 01 de 08 de 2015, de

<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20clean-up%20system%20protocol.pdf>

### ANEXO III Consentimiento Informado para el paciente que participa en el estudio

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

**Título de la investigación:** “*H. pylori*, mutaciones génicas, resistencia a los antimicrobianos y posible fallo terapéutico”

**PATROCINADOR/A:** PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR

**Investigador/a principal:** Dr. Jorge Reyes

**Co - Investigadores:**

Katherine Guzmán

Eduardo Morales

**Teléfono de contacto:** 0994551824

**e-mail:** jorgereyes83@gmail.com

#### **Antecedentes:**

*Helicobacter pylori* es una bacteria que se encuentra en el estómago y que produce inflamación crónica. En el Ecuador, es necesario demostrar la necesidad de realizar un perfil de sensibilidad de muestras de *H. pylori* antes de prescribir un tratamiento antibiótico evitando un posible fallo terapéutico.

#### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El estudio intentará determinar la resistencia a antibacterianos utilizados para el tratamiento de *H. pylori* y las cepas resistentes de este patógeno que se podrían asociar al fallo terapéutico.

#### **¿Qué sucederá en este estudio?**

Durante el estudio un personal entrenado realizará el procedimiento para extracción del material biológico (biopsia gastrica) que servirán para la investigación de *H. pylori*

#### **¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?**

Los resultados inmediatos obtenidos de las pruebas realizadas en el estudio, ayudará al personal médico para mejorar el tratamiento y disminuya el fallo terapéutico, por tanto los resultados serán de mucha importancia para los futuros usuarios de nuestra casa de salud.

#### **¿Tengo que participar?**

La decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, todos los servicios que usted recibe en este hospital continuarán, sin ningún cambio. También puede optar por retractarse más adelante y dejar de participar, incluso si usted estuvo de acuerdo al principio. Y no se le paga por participar y usted no tiene que pagar nada por participar en este estudio

**¿Mis registros se mantendrán en privado?**

Se mantendrá la confidencialidad de cualquier información personal que se obtiene en relación con este estudio y solo ante recurso legal se facilitará a los entes oficiales si así se solicita. Los datos se introducirán en una base de datos segura, a la que sólo los investigadores con clave, tendrán acceso. Usted será identificado por un número en la base de datos.

**FIRMAS**

Su firma en este formulario indica que usted ha entendido satisfactoriamente la información sobre su participación en el proyecto de investigación y está de acuerdo en participar. De ninguna manera renuncia a sus derechos legales, ni libera a los investigadores de sus responsabilidades legales y profesionales. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento sin poner en riesgo su atención médica.

Si tiene más preguntas sobre los asuntos relacionados con esta investigación, por favor póngase en contacto con:

Nombre del contacto: Jorge Reyes

Teléfonos: 0994551824

Email: jorgereyes83@gmail.com

---

a) Nombre del/la participante

---

Firma y fecha

\_\_\_\_\_  
c) Jorge Reyes/ Katherine Guzmán  
Eduardo Morales

\_\_\_\_\_  
Firma y fecha

Una copia firmada de este formulario de consentimiento se le ha entregado a usted para que la guarde y la conserve.

**RETRACCIÓN:**

Título del estudio:

Fecha: \_\_\_\_\_

Motivo de la retracción (obligatorio):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

a) Nombre del/la participante

\_\_\_\_\_  
Firma y fecha

#### **ANEXO IV Proceso de endoscopia digestiva alta**

El endoscopio consiste en un tubo de fibra óptica largo y flexible, con una cámara, La fuente de luz se consigue mediante arco de xenón (300 W) o filamento de Tungsteno (150 W), conectada a un vídeo, que permite ir viendo el interior del tubo digestivo, contiene canalizaciones en su interior que permiten (Beilenhoff, Neumann, Rey, & Biering, 2008):

- ✓ El ingreso de aire o líquido para distender el tubo digestivo e inspeccionarlo, así como lavar la zona inspeccionada,
- ✓ Introducir unas micro pinzas para la realización de biopsias y tomar muestras de tejido para su estudio microscópico, extraer pequeños cuerpos extraños que se hayan ingerido accidentalmente, pólipos de la mucosa digestiva, cauterizar varices o lesiones hemorrágicas, etc.
- ✓ Introducir microtijeras, y otras herramientas para realizar intervenciones en el esófago, estómago o intestino (extracción de pólipos, tumores, etc.).

#### **PREPARACION DEL PACIENTE**

- \* No deben ingerirse por el paciente alimentos ni líquidos de 6-8 horas antes del examen, por ello se realiza el procedimiento en la mañana.
- \* Siete días antes del procedimiento usted debe dejar de usar aspirina y productos que contienen ácido acetil salicílico, así como medicamentos para aliviar el dolor que se pueden obtener sin receta tales como: ibuprofeno (buprex, advil), naproxeno (apronax) y productos similares. El tomar tales productos puede aumentar el riesgo de sangrado durante el procedimiento o después de él. Después del procedimiento su médico le dirá cuándo podrá volver a tomar esas medicinas sin peligro
- \* En pacientes con obstrucción del esófago o a la salida del estómago el ayuno deberá ser más prolongado, incluso puede ser necesario un lavado gástrico previo.
- \* En cuanto a la sedación los criterios varían debido a que el paciente debe informar al médico si sufre de alergias, ayudando así a los que cuidan de su salud a escogerle el anestésico que lo adormecerá para que no sienta dolor o molestias durante el procedimiento entre los diferentes centros y culturas. Está demostrado que los pacientes de más edad toleran mayor la endoscopia sin sedación que los jóvenes.

- \* Debe acudir acompañado de un adulto que se responsabilice del traslado a su domicilio después de la exploración.
- \* No podrá conducir un vehículo en las 12 horas siguientes a la prueba
- \* Debe retirarse los lentes, dientes postizos o puentes removibles antes del procedimiento.
- \* Antes del procedimiento se le proveerá de una bata, además si
- \* No puede tomar alcohol las primeras 24 horas después de la sedación.

(González, Dávalos, Chávez, & Reyes, 2012) (Fábregas, 2002)

### **INTRODUCCION DEL ENDOSCOPIO**

- \* El paciente se ubica en la posición decúbito lateral izquierdo con la cabeza apoyada en una pequeña almohada.
- \* Colocar el protector bucal se sostiene el tubo del endoscopio por la marca de 30cm.
- \* Se pasa el extremo del endoscopio al interior del protector bucal, observándose por el ocular.
- \* La visión puede ser difícil en algunos pacientes que aplican con fuerza la lengua contra el paladar, en otros, los episodios nauseosos disminuyen si se indica al paciente respirar profundo
- \* Considerar dos observaciones importantes: No avanzar sin visión y ante la duda retiras el endoscopio.
- \* El endoscopio en el interior permite realizar una rotación en sentido horario de 90°, se visualiza la incisura angular y antro  
También se observa:
  - ✓ Curvatura menor con la incisura situada al final.
  - ✓ Los pliegues longitudinales de la curvatura mayor a la izquierda.
  - ✓ La cara posterior del estómago hacia abajo

### **RETIRADA DEL ENDOSCOPIO**

Se debe examinar cuidadosamente el duodeno, estómago y esófago.

Nunca debe descuidarse la exploración durante la fase retrograda del examen

(González, Dávalos, Chávez, & Reyes, 2012) (Fábregas, 2002) (Beilenhoff, Neumann, Rey, & Biering, 2008)



## **ANEXO V Sembrado e Identificación de *Helicobacter pylori***

Sembrar en Columbia Blood Agar suplementado con 7% de sangre de cordero y *Helicobacter pylori* selective supplement (DENT), obteniendo cepas puras incubadas a 37°C en condiciones microaerófilas (5% de CO<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>)

Tiempo de incubación: 3 – 15 días

Observar las cepas en un estereomicroscopio o con bastante iluminación artificial a los 7 días, de lo contrario se dejara 8 días más en la incubadora en las condiciones microaerófilas.

### **Identificación:**

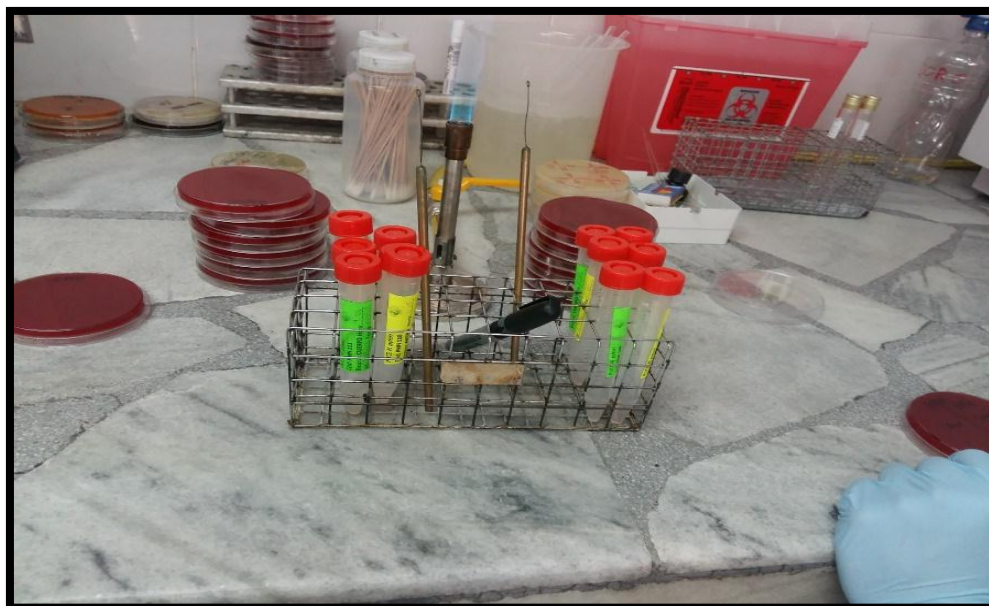
- ❖ Colocar 5-10µl de agua destilada en el portaobjetos, con unas pocas colinas mezclar dejar secar y realizar la Tinción Gram (Cristal violeta 1 min, Lugol 1 min, alcohol cetona 30 seg, y Safranina 1 min). Se observa bacilo curvos gram negativos
- ❖ Colocar una gota ( 25µl - 50 µl) de Peróxido de hidrogeno o agua oxigenada, inmediatamente con el asa llevar colonias de *H. pylori* y observar el burbujeo espontáneo
- ❖ Oxidasa, colocar en la tirilla una gota de agua destilada o desionizada, luego aplicar unas colonias en la parte húmeda de la tirilla, observando cambio de color que se debe a que *H. pylori* tiene la presencia de la enzima citocromo-oxidasa.
- ❖ Siembra en agar de urea al 10%, observa el cambio de color amarillo a rosa, dada por la producción de la enzima ureasa

## **ANEXO VI Ilustración gráfica del transporte y sembrado de biopsias gástricas**

**Fotografía 1 Preparación de tubos estériles con solución salina**



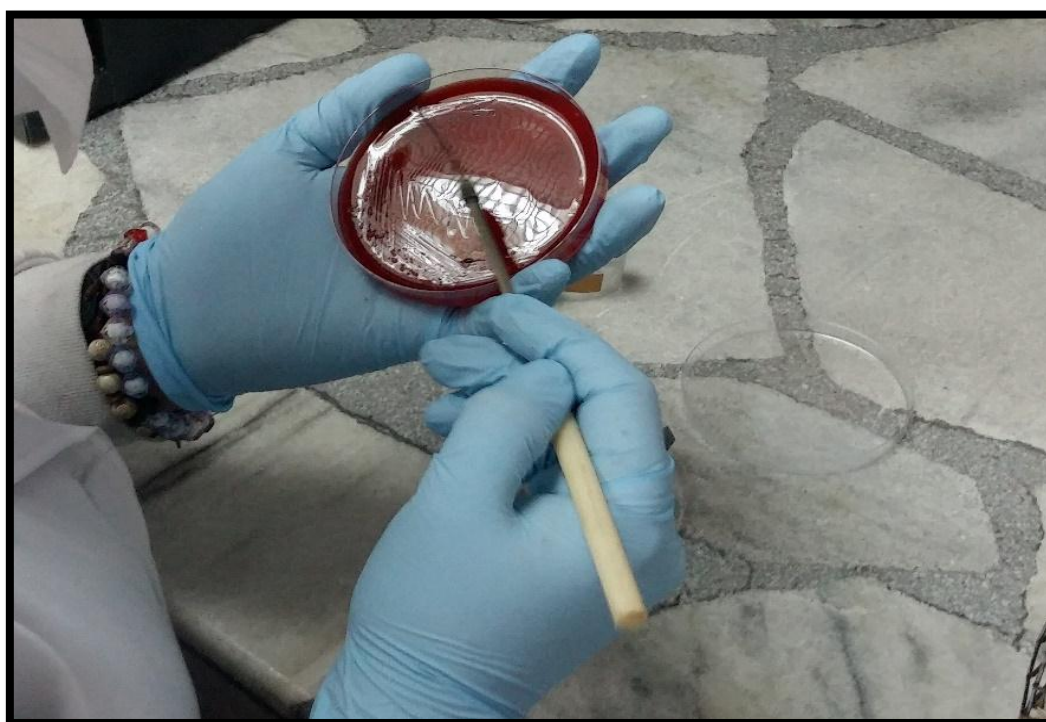
**Fotografía 2 Retorno de las biopsias gástricas al laboratorio de microbiología dentro de las 5 horas desde su toma**



**Fotografía 3 Corte de las biopsias gástricas con material estéril**



**Fotografía 4 Sembrado de las biopsias gástricas en Agar Columbia con 7% sangre de cordero**



**Fotografía 5 Incubación de las muestras en condiciones microaerófilas**



**Fotografía 6 Colonias de *H. pylori* en agar Columbia después de días de incubación**



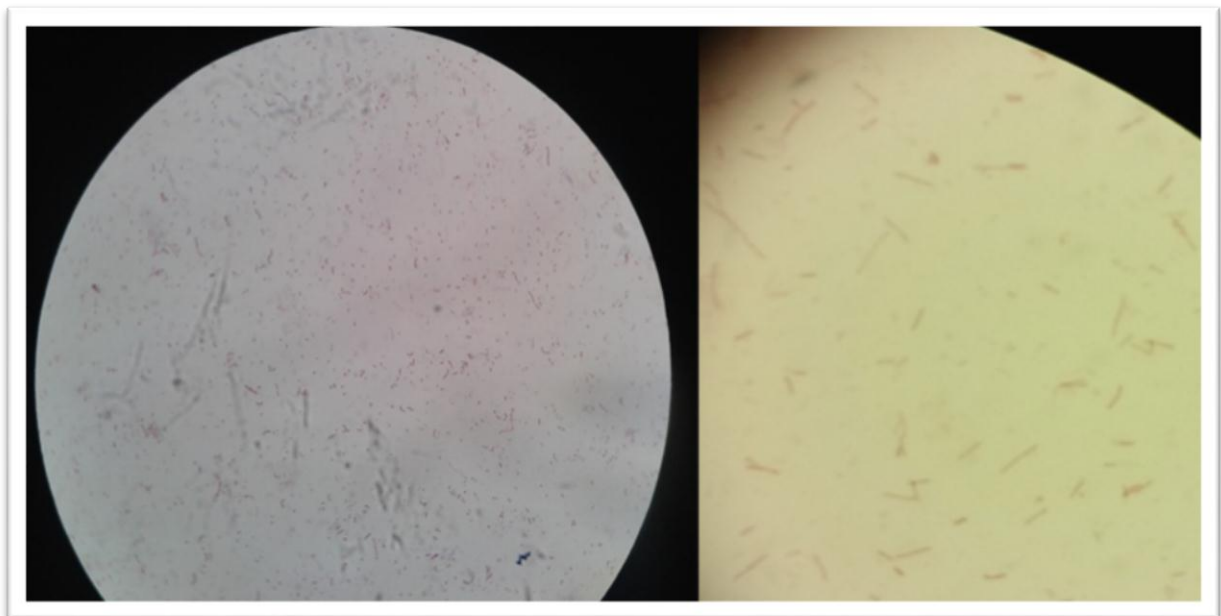


## ANEXO VII Ilustración gráfica de la identificación de colonias de *H. pylori*

Fotografía 7 Colonias de *H. pylori* para realizar la identificación



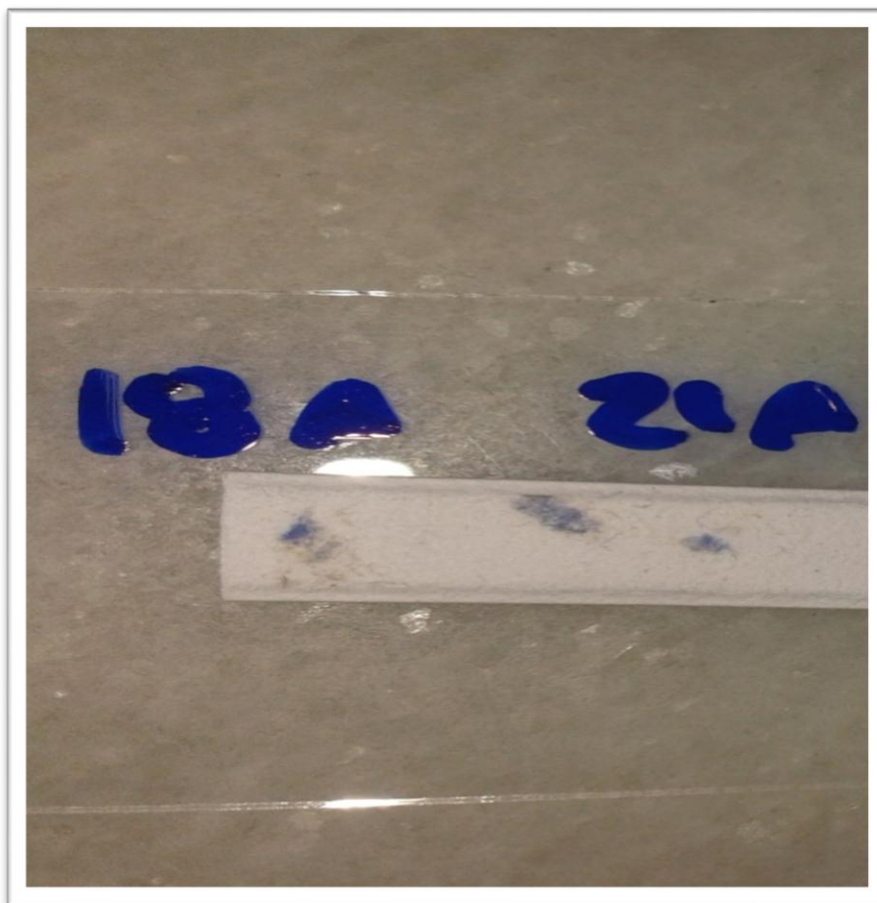
Fotografía 8 Tinción GRAM de las colonias de *H. pylori*



Fotografía 9 Prueba de catalasa



**Fotografía 10 Prueba de oxidasa**



## ANEXO VIII Procedimiento para la crio-preservación de las cepas de *Helicobacter pylori*

### Preparación del BHI + glicerol al 20% + 10% suero

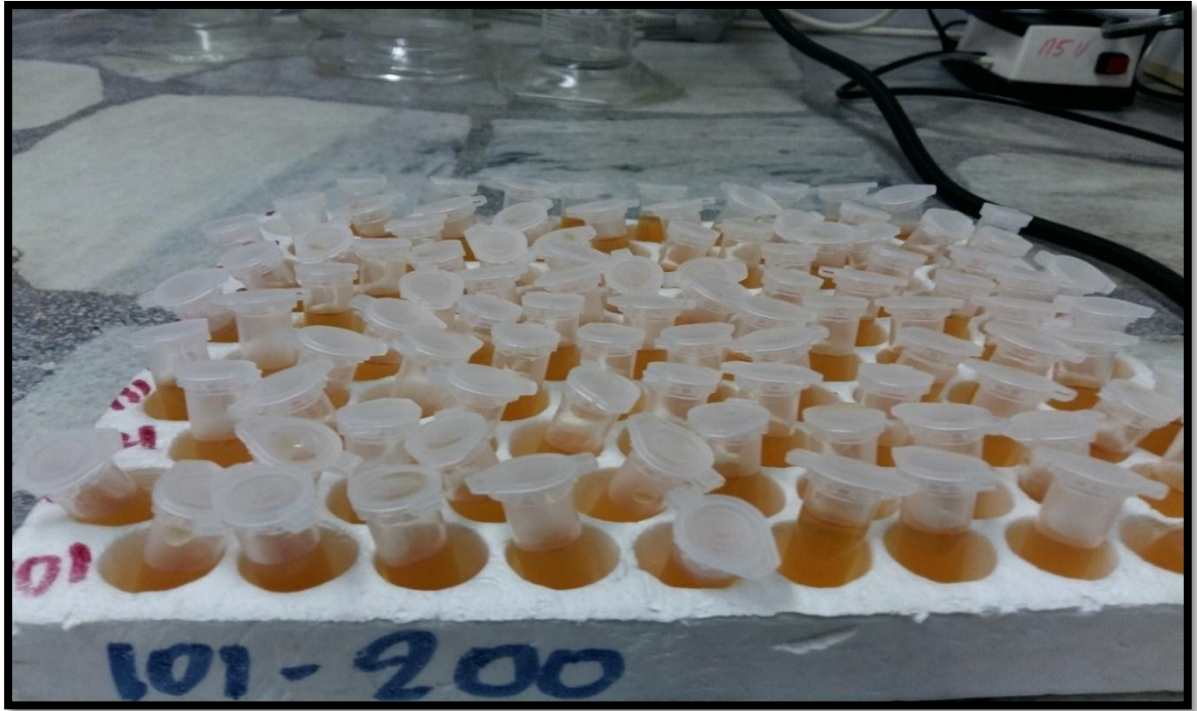
Para la preparación del medio de preservación de la muestra se utilizó el caldo Infusión cerebro-corazón (BHI) y se le adicionó glicerol y suero humano inactivado previamente, para obtener una concentración final del 20% de glicerol, siguiendo la siguiente fórmula:

Componente	Cantidad
Infusión cerebro -corazón (BHI)	90g
Solvente (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> )	80mL
Glicerol	20mL
Suero	10 mL

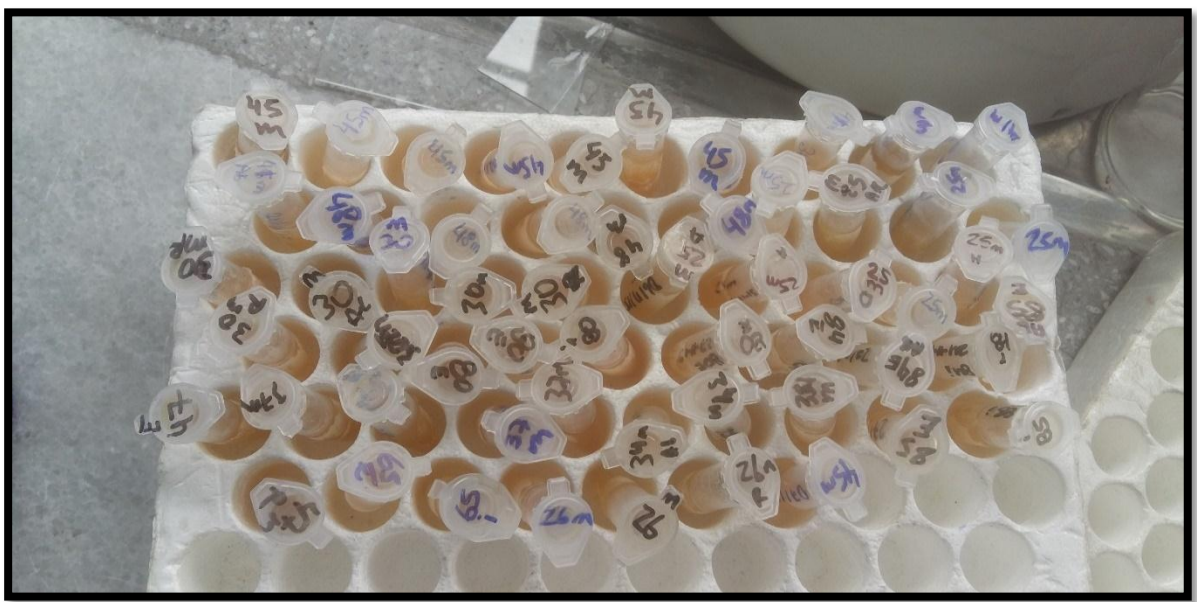
- Mezclar los componentes, hervir y observar que se forme una solución homogénea.
- Dispensar 1ml del medio en los criotubos y esterilizar bajo las siguientes condiciones: 15 min a 120°C y 15 libras de presión. El indicativo de esterilidad se evidencia con el uso de cinta testigo.
- Inactivar el suero humano, colocando a temperatura de 56 a 60°C por 30 minutos; cada 10 minutos mezclar y homogenizar el suero por 2 minutos.
- Para la preservación del microorganismo se debe arrastrar toda las cepas con un hisopo estéril y suspender en el medio BHI + Glicerol (20%).



**Fotografía 11** Caldo BHI + 20% glicerol + 10% suero humano, dosificado en tubos eppendorf para el almacenamiento de colonias puras de *H. pylori*



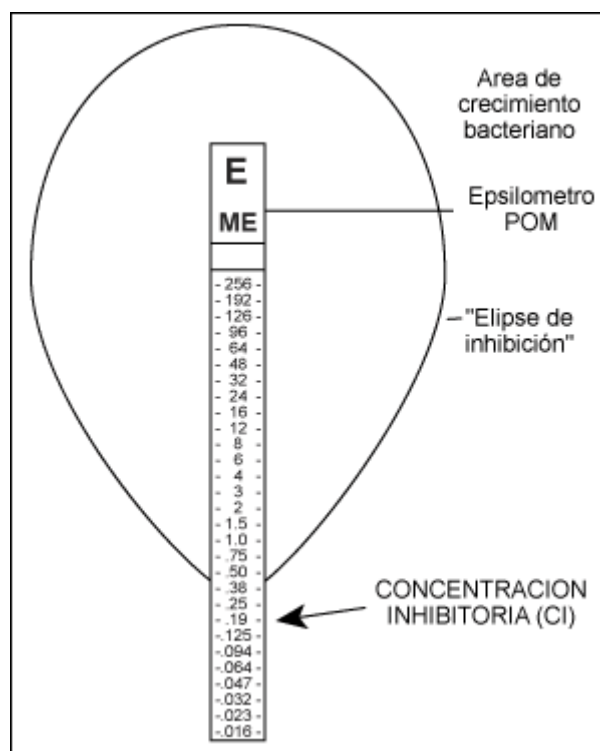
**Fotografía 12** Colonias de *H. pylori* colocados en el caldo de BHI antes de ser almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$



## ANEXO IX Protocolo del antibiograma por el método de tirilla de gradiente (E-test)

### 1<sup>er</sup> día

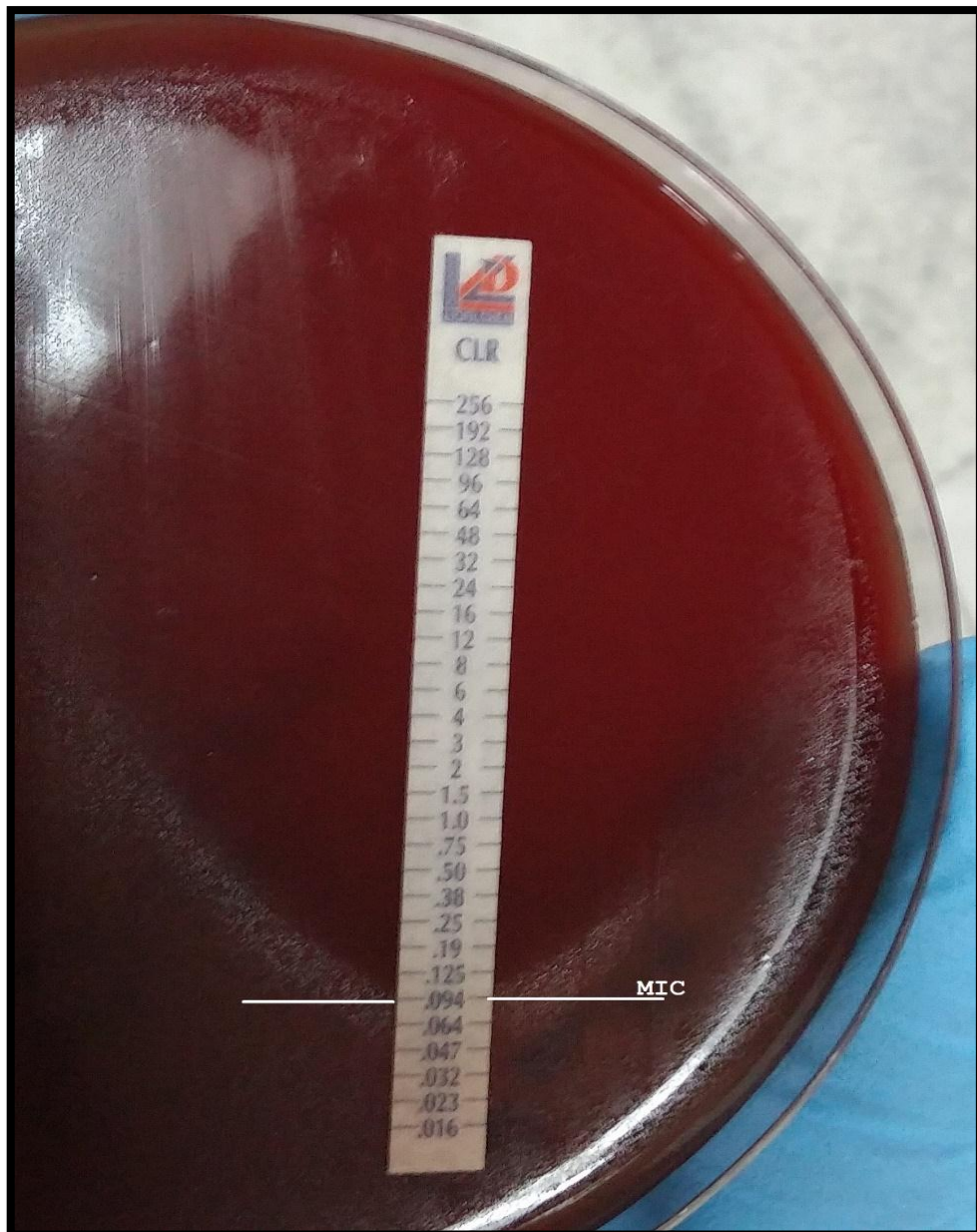
- \* Con las colonias suspendidas en el caldo de BHI con glicerol e incubadas por 5 días en las condiciones microaerófilas, se procede a leer la suspensión en un densitómetro para obtener una concentración de 2 a 4 en la Escala de McFarland.
- \* Luego se coloca 250µL de la suspensión en el Agar Mueller Hinton con 7% de sangre de cordero, con un hisopo estéril estriar en tres direcciones diferentes sobre la superficie del agar.
- \* Colocar la tirilla de Claritromicina que presenta una MIC de 0,016 – 256 mg/L.
- \* Incubar a 37°C en un ambiente microaerófilo (5% de CO<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>) durante 5-6 días.
- \* Leer el halo y anotar para comparar con los puntos de corte EUCAST, 2016



**Figura 7 Esquema gráfico del método E-test**

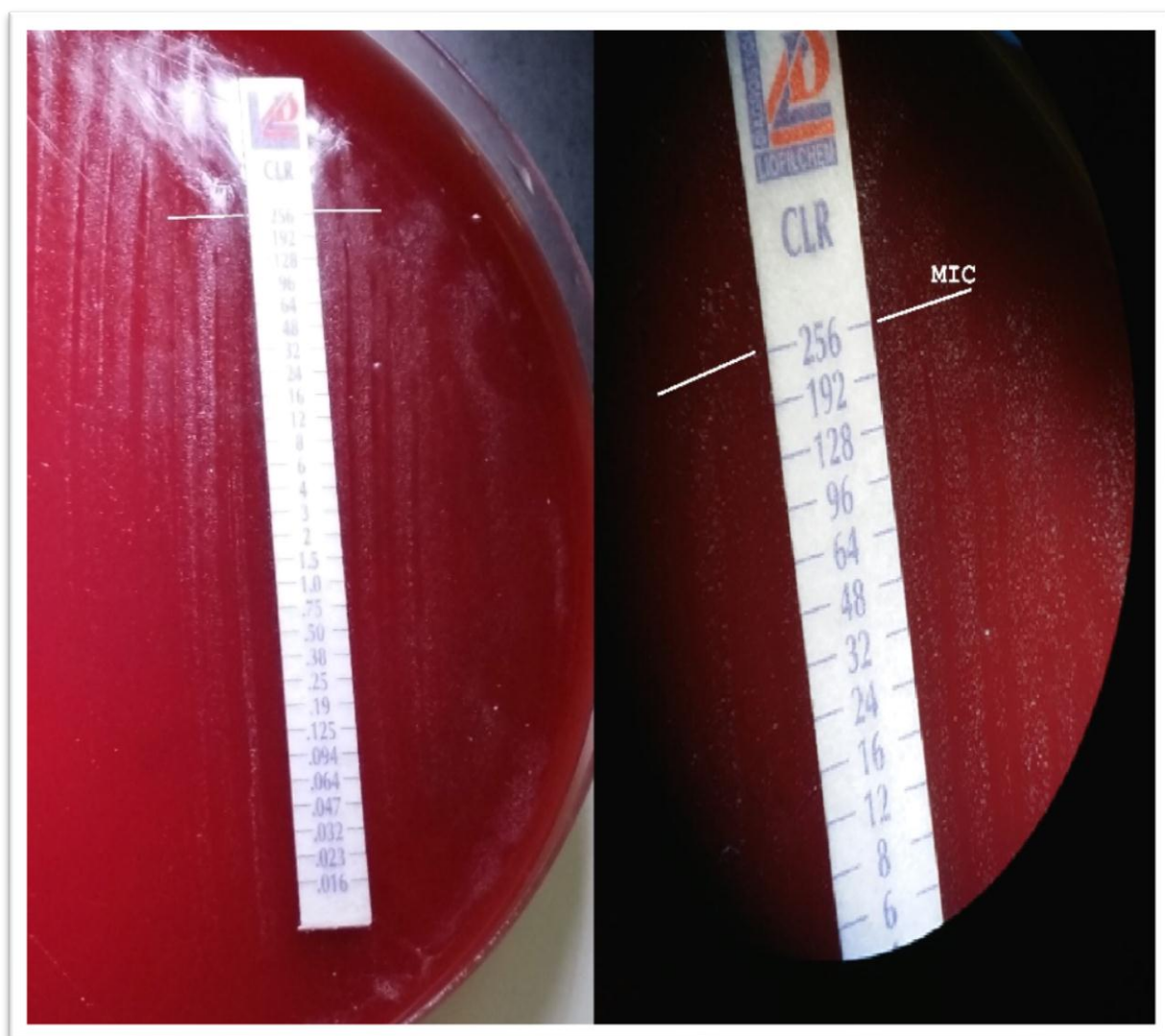
Fuente:Palavencio, E. (1998). Interpretacion de los estudios de susceptibilidad antimicorbiana. *Boletin de la Escuela de Medicina*, 1-4. Obtenido de <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/laboratorio/Interpretacion.html>

**Fotografía 13 MIC Sensible a la Claritromicina en colonias de *H. pylori***





**Fotografía 14 MIC Resistente a la Claritromicina en colonias de *H. pylori***



**ANEXO X Puntos de corte para *H. pylori*. EUCAST, 2016**

*Helicobacter pylori*

**EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0, valid from  
2015-01-01**

**Disk diffusion criteria for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* have not yet been defined and an MIC method should be used. If a commercial MIC method is used, follow the manufacturer's instructions.**

Penicillins	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Amoxicillin	0.125 <sup>1</sup>	0.125 <sup>1</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.

Fluoroquinolones	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Levofloxacin	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.

Macrólidos	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Clarithromycin	0.25 <sup>1</sup>	0.5 <sup>1</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Tetracycline	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.

Miscellaneous agents	MIC breakpoint (mg/L)		Notes Numbers for comments on MIC breakpoints
	S ≤	R >	
Metronidazole	8 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility.
Rifampicin	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	

(EUCAST, 2016)

## **ANEXO XI Protocolo de Extracción mediante el uso de Wizard® Genomic DNA Purification Kit**

### **Procedimiento para Bacterias GRAM NEGATIVAS**

#### ***Pellet Cells (Sedimento celular)***

- Centrifugar 1ml de un cultivo de 24 horas por 2 minutos a 14000rpm.
- Descartar el sobrenadante

#### **Lisis celular**

- Añadir 600µl de Nuclei Lysis Solution. Pipetear suavemente para mezclar.
- Incubar por 5 minutos a 80°C, luego enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 3µl de RNase Solution, mezclar e incubar a 37°C por 15-60 minutos, luego enfriar a temperatura ambiente.

#### **Precipitación proteica**

- Añadir 200µl de Protein Precipitation Solution. Vortex
- Incubar en hielo por 5 minutos
- Centrifugar a 14000rpm, por 3 minutos.

#### **Precipitación del DNA y rehidratación**

- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y limpio que contenga 600µl de Isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar.
- Centrifugar por 2 minutos a 14000rpm, y decantar el sobrenadante.
- Añadir 600µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente. Mezclar
- Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm
- Aspirar el etanol y dejar secar el pellet por 10-15 minutos.
- Rehidratar el pellet de DNA con 100µl de Rehydration Solution por 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.

(Promega, 2014)

## ANEXO XII Protocolo de trabajo para la PCR

**Tabla 7 Master Mix para el 23S de *Helicobacter pylori***

<b>PCR 23S RNAr</b>				
<b>Reactivos</b>	Concentración inicial	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (uL)	Volumen para 7 reacciones Master Mix (uL)
<b>GoTaq MASTER MIX</b>	2X	1.12uM	14	98
<b>PF-K1</b>	10uM	0.8uM	2	14
<b>PR-K2</b>	10uM	0.8uM	2	14
<b>Agua molecular</b>	--	--	2	14
<b>DNA</b>			5	
<b>Volumen total por reacción</b>			25	

Colocar el termociclador y programar en las siguientes condiciones:

	<b>Temperatura ( °C )</b>	<b>Tiempo</b>
Denaturación inicial	95	5min
Denaturación	95	30 seg
Número de ciclos	35	
Anilamiento	54	30 seg
Extensión	72	30 seg
Extensión final	72	10 min



## **ANEXO XIII Protocolo de la purificación mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.**

### **Procedimiento**

- Preparar la solución “Membrane Wash”: Añadir 375 ml de Etanol 95%, este volumen se coloca de acuerdo al número de reacciones del kit (250)}
- Realizar la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%, en cada pocillo colocar 20µl del amplicón
- Rotular los microtubos de 1,5mL con el código de muestra. Pesar cada tubo vacío (Peso 1)
- Revelar el gel y cortar la banda y transferir a los microtubos de cada muestra. Pesar los microtubos con la muestra (Peso 2)
- Obtener el peso del gel mediante la siguiente operación (Peso 2 – Peso1)
- Añadir Membrane Binding Solution, 10µl por cada 10mg de gel.
- Vortex por 1 minuto. Incubar a 50 – 60°C por 10 minutos (El gel disuelto no se vuelve a solidificar)
- Transferir la mezcla del gel a las Minicolumnas e incubar por un minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Descartar el residuo del tubo colector.
- Lavar la columna añadiendo la solución Membrane Wash, la cual fue previamente reconstituida.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Descartar el residuo del tubo colector.
- Colocar 500ul de Membrane Wash en cada columna y Centrifugar a 14 000 rpm durante cinco minutos.
- Añadir 50ul de agua libre de nucleasas, directamente en la columna, con la precaución de no tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto.
- Descartar la columna y el DNA purificado almacenar de 4°C o -20°C.  
(Promega Corporation, 2014)

#### **ANEXO XIV Procedimiento para enviar las muestras a secuenciar en MacroGen**

- En excel-97, ingresar el código y las secuencias Forward y Reverse del gen a secuenciar. Que las muestras purificadas contenga el mismo código del tubo transportador del producto de PCR amplificado, además de las secuencias Forward y Reverse de cada gen.
- Ingresar a la página de MACROGEN: [http://dna.macrogen.com/eng/order/ces/std/s\\_new\\_step1.jsp](http://dna.macrogen.com/eng/order/ces/std/s_new_step1.jsp), llenar el formulario establecido para la orden.
- Importar el archivo de Excel y revisar los datos ingresados que coincidan los códigos del documento con los que se encuentran escritos en los tubos a enviar.
- El envío se realiza a través de la empresa FEDEX, el paquete de envío incluye los tubos rotulados adecuadamente junto a la orden generada.

(Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas , 2011)

# ANEXO XV Datos de los pacientes presentes en estudio

<b>CODIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>GENERO</b>	<b>HISTOPATOLOGICO</b>	<b>MICROBIOLOGICO</b>
<b>PHPE 1</b>	36	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 2</b>	75	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 3</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 4</b>	72	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 5</b>	54	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 6</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 7</b>	69	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 9</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 10</b>	28	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 11</b>	61	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 12</b>	25	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 13</b>	57	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 14</b>	22	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 15</b>	46	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 16</b>	31	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 17</b>	31	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 18</b>	34	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 19</b>	51	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 20</b>	52	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 21</b>	25	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 22</b>	72	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 23</b>	22	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 25</b>	55	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 26</b>	28	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 27</b>	50	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 28</b>	47	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 29</b>	18	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 30</b>	25	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 32</b>	40	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 33</b>	46	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 34</b>	26	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 36</b>	40	M	+	NO CRECIMIENTO

<b>PHPE 37</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 38</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 39</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 40</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 41</b>	34	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 42</b>	54	M	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 44</b>	37	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 45</b>	34	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 46</b>	35	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 47</b>	55	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 48</b>	56	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 49</b>	87	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 51</b>	43	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 52</b>	58	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 53</b>	50	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 55</b>	74	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 56</b>	49	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 57</b>	57	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 58</b>	38	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 62</b>	0	0	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 65</b>	0	0	0	CRECIMIENTO
<b>PHPE 66</b>	72	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 67</b>	82	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 68</b>	68	M	0	CRECIMIENTO
<b>PHPE 69</b>	55	M	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 70</b>	20	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 71</b>	52	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 72</b>	33	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 73</b>	46	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 74</b>	85	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 75</b>	40	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 76</b>	49	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 77</b>	76	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 80</b>	71	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 81</b>	64	F	+	CRECIMIENTO

<b>PHPE 84</b>	79	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 85</b>	56	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 86</b>	18	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 87</b>	53	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 89</b>	36	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 90</b>	68	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 91</b>	68	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 92</b>	60	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 93</b>	47	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 94</b>	52	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 95</b>	45	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 96</b>	36	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 97</b>	28	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 99</b>	31	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 100</b>	52	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 101</b>	25	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 103</b>	50	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 104</b>	40	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 105</b>	35	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 106</b>	75	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 107</b>	54	M	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 108</b>	21	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPE 109</b>	19	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 111</b>	36	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 1</b>	82	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 10</b>	49	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 100</b>	61	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 101</b>	45	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 102</b>	46	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 103</b>	56	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 104</b>	49	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 105</b>	73	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 106</b>	35	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 107</b>	39	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 108</b>	50	M	+	CRECIMIENTO

<b>PHPM 109</b>	64	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 11</b>	52	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 110</b>	71	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 111</b>	18	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 112</b>	44	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 113</b>	29	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 114</b>	29	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 116</b>	56	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 117</b>	39	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 118</b>	50	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 12</b>	60	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 122</b>	59	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 13</b>	33	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 14</b>	68	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 15</b>	46	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 16</b>	52	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 17</b>	68	F	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 18</b>	44	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 19</b>	43	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 2</b>	72	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 20</b>	52	F	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 21</b>	66	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 22</b>	62	M	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 23</b>	66	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 24</b>	44	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 25</b>	63	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 26</b>	44	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 27</b>	42	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 28</b>	37	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 29</b>	70	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 3</b>	51	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 30</b>	42	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 31</b>	58	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 32</b>	36	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 33</b>	48	F	+	CRECIMIENTO

<b>PHPM 34</b>	49	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 35</b>	44	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 36</b>	56	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 37</b>	28	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 38</b>	69	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 39</b>	67	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 4</b>	45	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 40</b>	77	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 41</b>	78	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 42</b>	64	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 43</b>	39	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 44</b>	65	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 45</b>	82	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 46</b>	26	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 47</b>	41	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 48</b>	76	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 49</b>	69	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 5</b>	64	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 50</b>	53	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 51</b>	70	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 52</b>	67	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 53</b>	60	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 54</b>	44	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 55</b>	78	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 56</b>	50	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 57</b>	34	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 58</b>	48	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 59</b>	56	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 6</b>	70	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 60</b>	81	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 61</b>	63	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 62</b>	57	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 63</b>	72	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 64</b>	45	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 65</b>	63	F	+	CRECIMIENTO

<b>PHPM 66</b>	82	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 67</b>	77	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 68</b>	53	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 69</b>	82	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 7</b>	33	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 70</b>	67	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 71</b>	61	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 72</b>	33	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 73</b>	57	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 74</b>	73	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 75</b>	50	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 76</b>	52	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 77</b>	47	M	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 78</b>	75	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 79</b>	52	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 8</b>	48	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 80</b>	56	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 81</b>	53	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 82</b>	27	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 83</b>	34	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 84</b>	52	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 85</b>	47	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 86</b>	43	M	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 87</b>	73	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 88</b>	0	0	0	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 89</b>	66	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 9</b>	68	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 90</b>	57	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 91</b>	65	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 92</b>	77	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 93</b>	60	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 94</b>	45	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 95</b>	27	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPM 96</b>	59	M	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 97</b>	81	F	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO

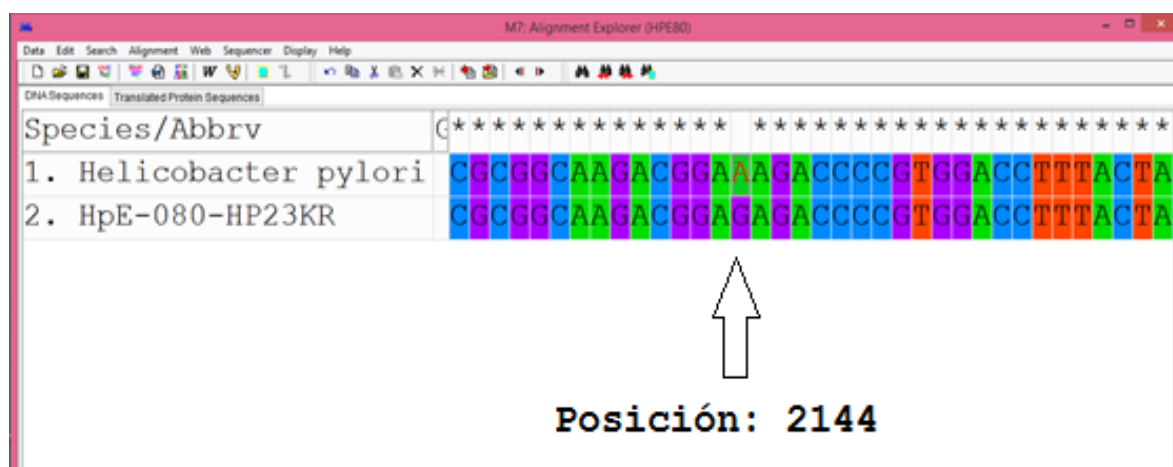


<b>PHPM 98</b>	65	M	NEGATIVO	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 99</b>	64	F	+	NO CRECIMIENTO
<b>PHPM 99</b>	65	F	+	CRECIMIENTO
<b>PHPE 1</b>	36	M	+	NO CRECIMIENTO

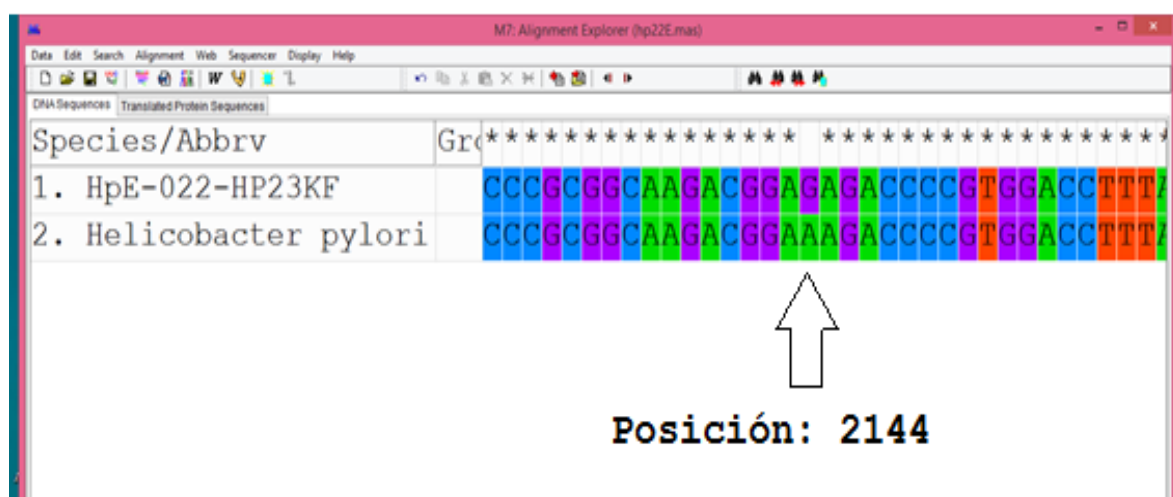
\* +, Indica la presencia de *Helicobacter pylori* en el reporte histopatológico

\*0, Sin datos

## ANEXO XVI Alineación de las secuencias del 23S RNAr e identificación de las mutaciones puntuales

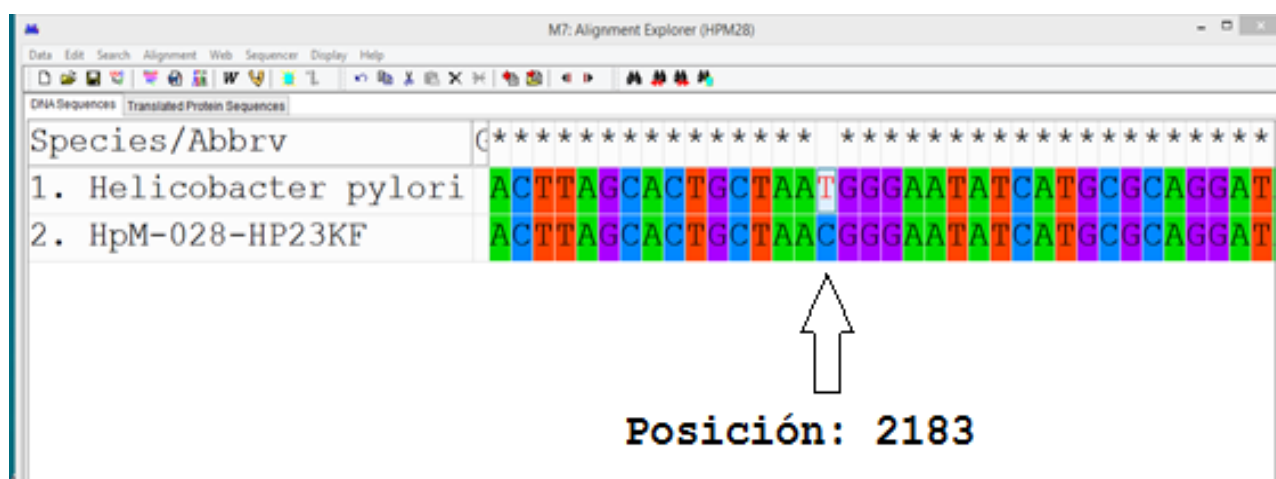


Elaborado: Katherine Guzmán



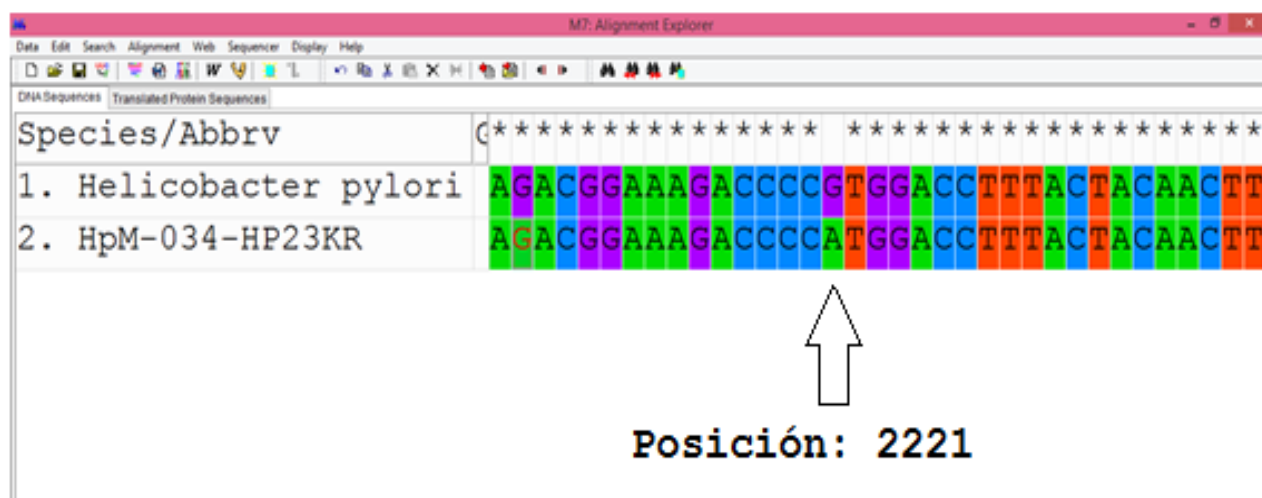
**Gráfico 3 Alineación de secuencias del fragmento 23S RNAr de las muestras PHPE 22, PHPE 80 para observar la mutación A2144G**

Elaborado: Katherine Guzmán



**Gráfico 4 Alineación del fragmento 23S RNAr de la muestra PHPM 28, mutación T2183C**

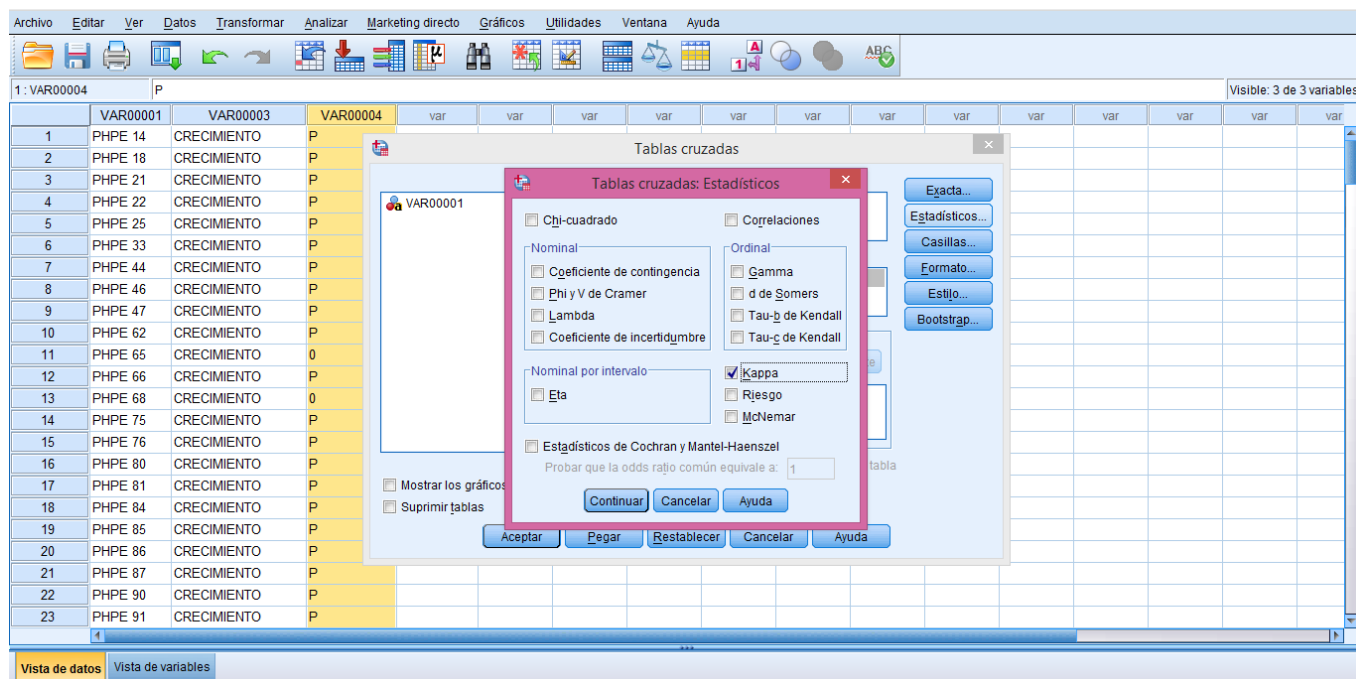
Elaborado: Katherine Guzmán



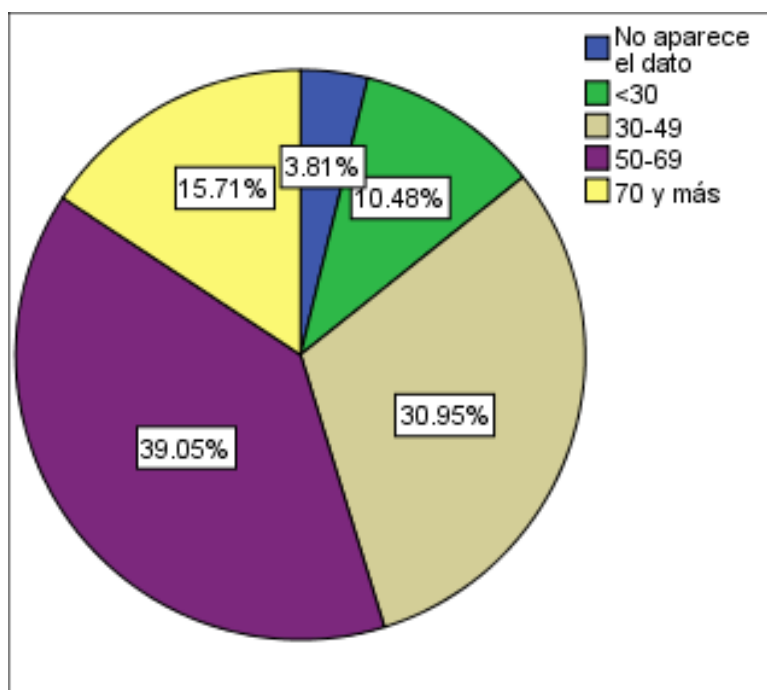
**Gráfico 5 Alineación de la secuencia del fragmento 23S RNAr de la muestra PHPM 34, presencia de la mutación G2221A**

Elaborado: Katherine Guzmán

## ANEXO XVII Gráficos de cálculos estadísticos

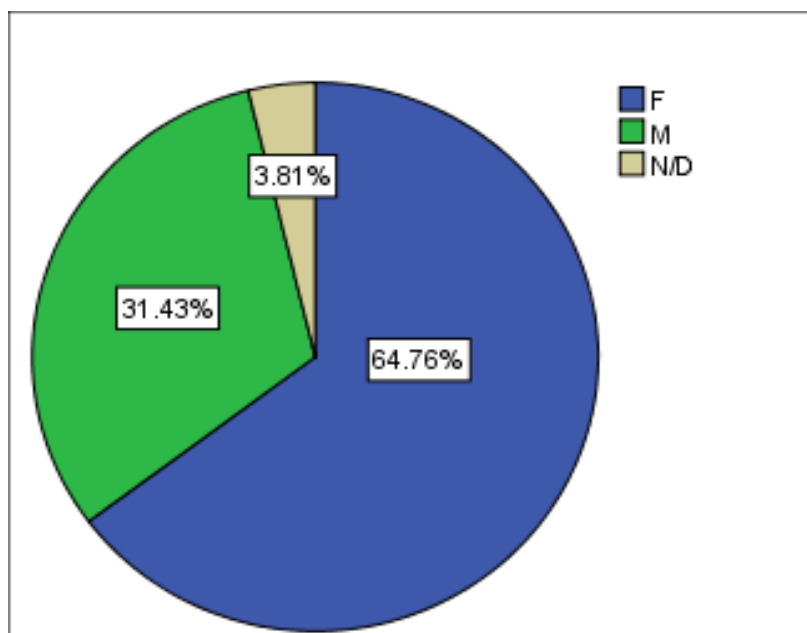


**Figura 8** Cálculo del Índice Kappa de Cohen en el programa SPSS



**Gráfico 6** Distribución de pacientes según grupo de edad

Elaborado: Katherine Guzmán



**Gráfico 7 Distribución de paciente según género**

Elaborado: Katherine Guzmán